

RECHERCHE D'UNE METHODE
DE DOSAGE DE L'ANTIGENE O
DE SALMONELLA TYPHI.

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement

le 9 Novembre 1959

par

JACQUELINE LESBROS

Diplômée de Bactériologie, Parasitologie, Sérologie.

RECHERCHE D'UNE METHODE
DE DOSAGE DE L'ANTIGENE O
DE SALMONELLA TYPHI.

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

présentée et soutenue publiquement

le 9 Novembre 1959

par

JACQUELINE LESBROS

Diplômée de Bactériologie, Parasitologie, Sérologie.



JURY :

MM. COURTOIS, Président

MALANGEAU
GERMAN

} Assesseurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547118_0020

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. René FABRE, Doyen Membre de l'Institut,
MM. JANOT, Assesseur ; G. CUVIER, Secrétaire Général
MM. L. JEANDEL, Secrétaire; A. QUILLIOT, Secrétaire.
Doyen Honoraire : M. RADAIS.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DELEPINE et LEBEAU, Membres de l'Institut
LAUNOY, FLEURY, MASCRE, PICON, BEDEL.

PROFESSEURS

MM. FABRE, Membre de l'Institut	Toxicologie
JANOT	Pharmacie Galénique
VALETTE	Pharmacodynamie
PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
GUILLIOT	Physique
GAUTIER	Chimie organique
Melle LAMBIN	Microbiologie
MM. RAOUL	Zoologie appliquée
COURTOIS	Chimie biologique
DOMANGE	Chimie minérale
CRETE	Botanique
TRUHAUT	Toxicologie et Hygiène industrielle
MORETTE	Hydrologie
CAVIER	Parasitologie
QUEVAUVILLER	Hygiène
MOREAU	Pharmacie chimique
GUY	Mathématiques appliquées aux Scien- ces physiques et biologiques
GERMAN	Technique bactériologique
PIETTE	Biologie sanguine
MALANGEAU	Chimie analytique
N.	Législation, Déontologie et Histoi- re de la Pharmacie

MAITRES DE CONFERENCE

MM. DEYSSON	Cryptogamie
FLAHAUT	Minéralogie
RENAULT Jean	Chimie organique
DILLEMANN	Biologie végétale
GIRARD	Chimie analytique
LARUELLE	Physique
LE MOAN	Toxicologie
ROSSIGNOL	Pharmacodynamie
LE HIR	Pharmacie galénique
RENAULT H.	Pharmacie chimique
DESVIGNES	Microbiologie
N.	Biochimie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. BORY	Sérologie
CORRIEZ	Physique
GARDENT	Chimie analytique (1ère année)
GESTEAU	Physique biologique
HARISPE	Chimie générale et Pharmaceutique
HENRY	Chimie analytique (2° et 3° année)
LECLERC	Chimie biologique
Melle LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
PELLERIN	Chimie analytique (2° et 3° année)
PERCHERON	Chimie 4° année
POTTIER	Pharmacie galénique et industrielle
Melle ROLLEN	Biologie végétale
SAVEL	Parasitologie
N.	Microbiologie

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. GOUTAREL	Chef de Travaux de Pharmacotechnie galénique
Melle MORIN	Chef de Travaux de Pharmacodynamie
M. LUSINCHI	Chef de Travaux de Pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Conservateur, chargé de la Direction : M. GARNIER

Conservateur : Melle LAVAUD

Bibliothécaires : Mmes DESGRIPPES et KREHMER.

A MON PERE

A MA MERE

A TOUS LES MIENS

A Monsieur le Professeur J. COURTOIS

qui nous a fait le grand honneur d'accepter la
présidence de cette thèse. Qu'il nous permette
de le remercier de ses conseils précieux et de
son accueil toujours bienveillant.

A Messieurs les Professeurs MALANGEAU et GERMAN

qui ont bien voulu accepter de juger ce travail,
en témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jacques TREFOUEL

Directeur de l'Institut Pasteur,

Membre de l'Institut et de l'Académie de Médecine,

qui nous a fait le grand honneur de nous admettre
dans la grande famille pasteurienne. Nous le re-
mercions et l'assurons de notre profond attachement
à l'Institut Pasteur.

A Monsieur le Docteur Antoine BONNEFOI

Chef du Service des Vaccins à l'Institut Pasteur,

qui nous a accueillie dans son Service avec la plus grande bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Mademoiselle A.M. STAUB

Chef de Laboratoire à la section d'Immunochimie
du Service des Vaccins,

qui n'a jamais cessé de nous témoigner les marques de sa bienveillance durant nos recherches dans son laboratoire. Nous lui devons l'inspiration et la réalisation de cette thèse et le meilleur de notre formation scientifique. Qu'elle nous permette de la remercier de ses précieux conseils, de ses encouragements et de l'assurer de notre respectueuse reconnaissance et de notre affection.

A Monsieur le Docteur L. LE MINOR

Chef de Laboratoire au Service des Vaccins,

qui n'a cessé de nous prodiguer au cours de ce travail ses conseils éclairés et bienveillants. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère et respectueuse gratitude.

Enfin, nous sommes heureuse de remercier tous ceux qui, dans le Service des Vaccins, nous ont accordé leur aide et ceux qui, dans les Services de Chimie thérapeutique, Chimie microbienne et Biochimie cellulaire, nous ont facilité l'usage des appareils de BECKMAN que possédaient ces Services.

I N T R O D U C T I O N

H I S T O R I Q U E

L'antigène somatique O de Salmonella typhi découvert par SMITH et REAGL (30) en 1903 est un constituant de la paroi de certaines souches de cette Salmonella. Ces souches forment des colonies d'un aspect lisse (smooth) caractéristique, ce qui les a faites appeler souches S. La perte de l'antigène O se traduit par un changement d'aspect des colonies qui deviennent rugueuses (rough) ; elles sont appelées alors souches R.

L'antigène O est responsable de la toxicité des bacilles et en partie de leur spécificité immunologique, c'est-à-dire qu'il contient une partie des motifs antigéniques responsables de l'agglutination de S. typhi par les immunsérums correspondants ; les autres motifs antigéniques propres à cette Salmonella étant portés soit par la protéine constitutive des flagelles (antigène H), soit par une enveloppe responsable pour certains de la virulence de S. typhi (antigène Vi).

L'antigène O contenant des groupements chimiques responsables de la toxicité des bacilles typhiques et d'autres responsables de leur spécificité immunologique, on conçoit toute l'importance que les bactériologistes lui attachent pour la préparation des vaccins et l'intérêt que représente pour eux la mise au point d'une technique capable de le doser dans les bacilles. Ils auraient ainsi un moyen de choisir les souches les plus riches en cet antigène lors de leur isolement et de contrôler sa présence au cours des repiquages au laboratoire.

Une méthode purement sérologique a été proposée par FELIX et PITT (10). Elle est basée sur l'absorption par les bacilles des agglutinines d'un sérum antityphique : on sature les anticorps présents dans un sérum donné par des

bacilles tués par la chaleur qui conservent leur antigène O ; plus la souche sera riche en antigène, moins il faudra de bacilles pour saturer le sérum. FELIX et PITT n'ont utilisé cette méthode que pour trois souches [10] pour lesquelles ils ont trouvé la même quantité d'antigène, mais ils n'ont jamais fait un dosage systématique des souches. Ils avaient annoncé [10] une application de cette technique à *S. Paratyphi A* et *S. paratyphi B*, mais ceci n'a pas eu de suite.

JUDE et NICOLLE [28] ont repris la méthode de FELIX et PITT, mais, connaissant les sources d'erreurs inhérentes à la technique même des agglutinations, ils ont pensé en augmenter la précision en déterminant graphiquement la quantité de bacilles susceptibles de faire baisser de 50 % le titre agglutinant du sérum (dilution limite du sérum capable d'agglutiner une suspension donnée de bacilles). Pour cela, ils ont établi la courbe des taux d'agglutinations (portés en ordonnées) en fonction des quantités de bacilles utilisés pour la saturation (portées en abscisses logarithmiques). Ils ont ainsi obtenu une droite sur laquelle il était facile de déterminer le point 50 % (dose efficace ou D.E. 50 %). Ces auteurs ont utilisé cette méthode en collaboration avec L. LE MINOR pour doser l'antigène O de deux variantes culturelles spontanées de *S. Typhi* [19].

Ces techniques séduisent, à première vue, par leur simplicité : elles sont, cependant, sujettes à de nombreuses critiques. En effet, elles ne permettent pas de déterminer combien une quantité donnée de bacilles contient d'antigène, mais seulement la quantité relative de cet antigène par rapport à une autre souche prise comme base de référence. Ceci exige donc que les sérums de référence soient les mêmes ou comparables d'un dosage à l'autre, ou que la souche de référence reste toujours identique à elle-même.

Or, la seule base de référence qui permettrait de comparer les sérums utilisés, le titre d'agglutination, est fausse. En effet, on connaît la multiplicité des anticorps présents dans les sérums anti *S. typhi* correspondant aux très nombreux "groupements déterminants" présents sur l'antigène O de cette *Salmonella*. STAUB et DAVARPANAH [35] ont montré d'une façon particulièrement nette, que deux sérums possédant un même titre agglutinant vis-à-vis d'une même suspension microbienne pouvaient très bien contenir des quantités très différentes de ces divers anticorps. Dans ces conditions, il est illusoire de vouloir déterminer la quantité d'antigène présent à la surface des

des bacilles par une méthode d'absorption. En effet, supposons que l'antigène O de nos bacilles contienne trois "groupements déterminants" A et deux "groupements déterminants" B. Si nous absorbons avec ces bacilles deux sérums possédant le même titre d'agglutinines, mais dont l'un (sérum I) est riche en anticorps A et l'autre (sérum II) en anticorps B, il faudra évidemment moins de bacilles pour saturer le sérum I (anti A) que le sérum II (anti B) ; pourtant, les deux groupements étant portés par l'antigène O, nous aurons, dans les deux cas, l'illusion de doser l'antigène O de nos bacilles. C'est ce qu'illustre l'exemple schématique porté sur le tableau I.

TABLEAU I

ABSORPTION DE DEUX SÉRUMS ANTI S.TYPHI PAR LA MÊME SUSPENSION DE BACILLES

	Sérum I Anti A	Sérum II Anti B
Titre agglutinant	I/6.400	I/6.400
Quantité d'anticorps présents	90 anti A + 20 anti B	20 anti A + 90 anti B
Quantité de bacilles (3A + 2B) nécessaire pour absorber les sérums	30	45
Quantité de polyoside présent dans les bacilles	X	$\frac{30}{45} = \frac{2}{3} X$

Puisqu'il n'existe pas de base de référence certaine pour les sérums, il faudrait que la souche, utilisée à cette fin, produise toujours la même quantité d'antigène O, ce qui est loin d'être certain, celle-ci variant avec le bouillon de culture utilisé et l'état de la souche [34].

Une dernière critique s'adresse, enfin, à l'état de l'antigène O à la surface des bacilles. En effet, chez la majorité des souches de S.typhi un antigène de surface Vi [11 et 12] recouvre l'antigène O et rend les souches inagglutinables par les sérums anti O (sans anticorps anti Vi). Cet antigène est thermolabile ; c'est pourquoi JUDE et NICOLLE, comme FELIX et PITT, chauffent les bacilles avant de doser leur antigène O. Rien ne nous assure cependant

que tout l'antigène Vi est bien parti et qu'il n'en reste pas des quantités plus ou moins importantes suivant les souches qui faussent le dosage en masquant l'antigène O et en empêchant l'absorption des anticorps O par ces parties de l'antigène. D'autre part, on sait qu'une fraction non négligeable de l'antigène O est séparée des bacilles au cours du chauffage. Cette propriété a même été utilisée par certains pour obtenir des préparations brutes d'antigène O [26].

Certains auteurs ont alors pensé remédier à tous ces inconvénients en dosant l'antigène O après son extraction des bacilles. On connaît plusieurs techniques pour effectuer cette extraction. BOIVIN et MESROBEANU [2] ont proposé l'acide trichloracétique, RAESTRICK et TOPLEY [29] la digestion trypsique et HENDERSON et MORGAN [18] le diéthyléneglycol. Mais seuls, à notre connaissance, BOIVIN, IZARD et SARCIRON [1] ont abordé le problème d'un dosage après extraction. Ces auteurs extraient l'antigène somatique par l'acide trichloracétique, puis effectuent un dosage immunologique au moyen d'antisérum spécifique anti O et rapportent la quantité de polyoside au poids des microbes.

Ce sont ces premiers résultats que STAUB et COMBES [32] ont repris et perfectionnés grâce à la technique quantitative plus moderne introduite par HEIDELBERGER et KENDALL [16] dans le dosage des précipités spécifiques. Mais STAUB et COMBES se sont heurtées à deux difficultés :

- 1) l'impossibilité d'extraire totalement l'antigène des bacilles (BOIVIN lui-même l'avait dit) [3].
- 2) l'impossibilité d'obtenir deux préparations identiques à partir de la même souche ; en particulier, le même poids de deux extraits différents ne précipite pas la même quantité d'anticorps d'un même antisérum.

STAUB et COMBES ont alors pensé à doser non plus la totalité de l'antigène, mais une fraction plus simple de cet antigène : l'haptène polyosidique.

En effet, on sait que l'antigène O est un complexe glucidolipidoprotidique contenant 45 % de polyoside ; s'il n'est pas certain que tous les motifs antigéniques de cet antigène soient portés par le polyoside [31], il a été maintes fois prouvé qu'il est responsable pour la majeure partie de la spécificité du complexe [27]. Chimiquement, on sait [36 et 40] qu'il est constitué de six sucres :

D glucosamine

D galactose

D glucose

D mannose

L rhamnose

tyvélose = (3.6 didésoxy D mannose [13]).

On pouvait effectivement penser que l'extraction, la purification et le dosage de ce polyside permettrait de titrer l'antigène O. C'est ce qu'ont prouvé STAUB et COMBES en utilisant pour l'extraction l'hydrolyse acétique préconisée par FREEMAN [14] à la suite de B. WHITE [42] qui permet d'obtenir quantitativement la totalité du polyside présent dans les bacilles et en mettant au point une technique qui leur a permis de doser immunologiquement ce polyside d'une façon précise et fidèle. Le poids de polyside était alors rapporté au poids d'azote contenu dans la même quantité de bacilles, ce dosage étant beaucoup plus précis que la pesée des bacilles utilisée par IZARD et SARCIRON.

Ce dosage repose sur une base de référence (le polyside) facile à reproduire d'un laboratoire à l'autre ; mais elle n'est pas sans présenter des inconvénients certains :

1) Elle est longue (il faut compter environ 15 jours pour doser trois souches).

2) Elle repose sur un dosage immunochimique et nécessite un sérum étalon en assez grande quantité, ce qui entraîne l'emploi de sérum de cheval assez coûteux.

LANDY [38] a alors proposé d'utiliser la présence du rhamnose dans le polyside spécifique comme base de dosage. En effet, le polyside spécifique contient du rhamnose et, ce qui est important, le polyside extrait des souches dépourvues d'antigène O (souches R) n'en contient pas [41].

De plus, il existe une technique rapide, décrite par DISCHE et SHETTLES [6] pour doser le rhamnose : elle est basée sur la couleur du composé formé en présence de rhamnose, d'acide sulfurique concentré et de chlorhydrate de cystéine. LANDY l'a utilisée pour doser le polyside dans des extraits, mais les résultats qu'il a obtenus ne sont pas très convaincants (TABLEAU II). Il ne l'a pas utilisée pour doser le polyside dans les bacilles.

TABLEAU II

DOSAGE DU POLYOSIDE O

DANS DIVERS EXTRAITS A DIFFERENTS STADES DE PURIFICATION,

D'APRES LANDY [38]

Extraits	Dosage immunologique	Dosage par le Rhamnose
a	15,7	8,2
b	12,2	10,3
c	20,2	13,5
d	34,7	27,6
e	2,7	4

Nous nous sommes alors proposée de reprendre l'idée de LANDY et de doser le rhamnose dans les extraits tels que les préparaient STAUB et COMBES [34] et dans les bacilles eux-mêmes, si cela était possible.

Pour cela, il fallait rechercher si :

- 1) les polyosides purs extraits de diverses souches contenaient tous la même proportion de rhamnose,
- 2) le polyoside contenu dans les extraits préparés suivant la technique de STAUB et COMBES contenait la même quantité de rhamnose que le polyoside purifié,
- 3) le dosage du rhamnose directement effectué sur les bacilles donnait les mêmes résultats que celui effectué sur les extraits.

PLAN DU TRAVAIL

Ce travail comportera donc 3 parties :

I - Préparation et étude des polyosides purifiés extraits de différentes souches de S. Typhi.

II - Recherche d'une technique permettant d'obtenir des extraits contenant des polyosides identiques entre eux et identiques au polyoside purifié.

III - Mise au point et première application d'une technique de "routine".

Mais nous voudrions, auparavant, donner les caractéristiques des souches de S. Typhi que nous avons utilisées au cours de ce travail.

CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE S.TYPHI
AYANT ETE UTILISEES AU COURS DE CE TRAVAIL

SOUCHES	92	S.Typhi V mobile lysotype D _I biotype I (xylose + arabinose -)
	415	S.Typhi mobile Variante W de la culture V de lysotype D _I ^N biotype II (xylose - arabinose -)
	556 ou 50.II	S.Typhi V mobile lysotype O biotype I (xylose + arabinose -)
	1035	S.Typhi V mobile lysotype B ₂ biotype II (xylose - arabinose -)
	1300	S.Typhi V mobile lysotype C _I biotype I (xylose + arabinose -)
	1470	S.Typhi V mobile lysotype I + IV biotype II (xylose - arabinose -)
	1490	S.Typhi V mobile lysotype I + IV biotype II (xylose - arabinose -)
	1562	S.Typhi V mobile lysotype E _I biotype I (xylose + arabinose -)
	1566	S.Typhi V mobile lysotype E _I biotype I (xylose + arabinose -)

35.52		S.Typhi W immobile, analogue à la souche O 901 [21] biotype I (xylose + arabinose -)	
J 07		S.Typhi V mobile lysotype D _I biotype I (xylose + arabinose -)	
5979	{	S.Typhi V mobiles	
5980			lysotype A
5981			
5982			biotype I (xylose + arabinose -)

PREMIERE PARTIE

PREPARATION ET ETUDE
DES POLYOSIDES PURIFIES
EXTRAITS DE DIFFERENTES
SOUCHES DE S. TYPHI

Nous avons suivi, pour préparer ces polyosides, une technique préconisée par B.WHITE [42], reprise et perfectionnée par G.FREEMAN [14] : le polyoside est extrait directement des bacilles par une hydrolyse acétique, puis purifié par une série d'opérations.

Les principaux temps de cette méthode sont les suivants : 3 extractions des bacilles par une solution décinormale d'acide acétique, concentration des hydrolysats sous vide, précipitations fractionnées alcooliques entre 50 et 86 % d'alcool distillé (°), 3 précipitations par l'acide acétique glacial à 94 %, enfin 3 précipitations fractionnées par l'alcool pour éliminer l'acide acétique, dialyse et lyophilisation.

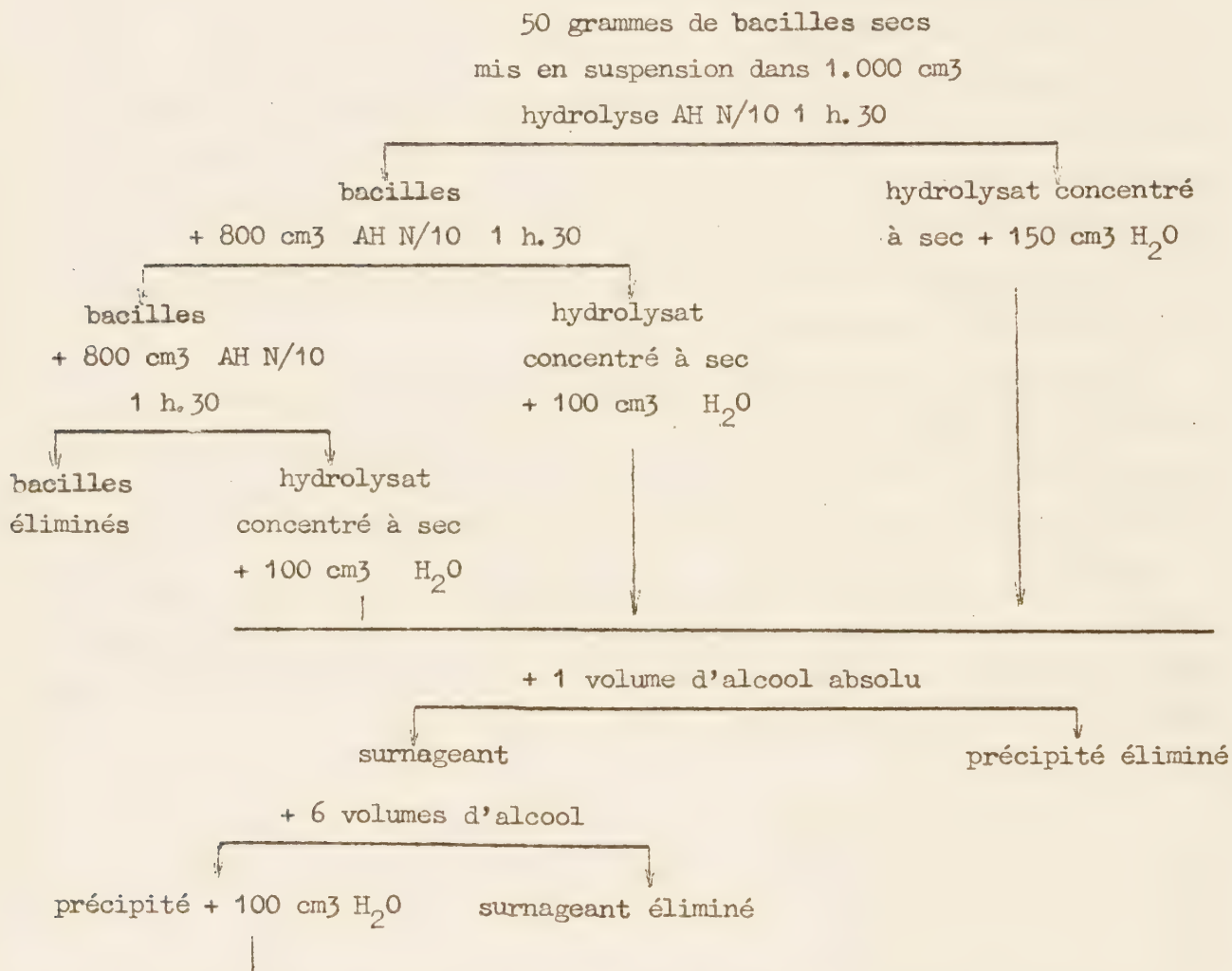
Nous avons ainsi préparé 6 polyosides à partir des six souches : T.556 W V , T.556 W , T.415 W, T.35.52, T.1300 W V, T.1470 W V, contenant soit les antigènes O, H et Vi (T.556 W V, T.1300 W V, T.1470 W V) soit O et H (T.556 W, T.415 W) soit l'antigène O seulement (T.35.52).

Nous avons alors dosé l'azote des 6 polyosides afin de nous assurer de la pureté de nos préparations, puis dosé le rhamnose et déterminé leur pouvoir précipitant vis à vis d'un même sérum anti S.Typhi afin de vérifier leur identité.

(°) - L'alcool utilisé est toujours distillé deux fois : la première sur acide phosphorique et la deuxième sur potasse afin d'éliminer les impuretés qui pourraient précipiter avec le polyoside.

S C H E M A I

Schéma de la préparation du polyoside par hydrolyse des
bacilles au moyen d'une solution N/10 d'acide acétique (AH N/10) :



5 précipitations fractionnées alcooliques (1 volume puis 6 volumes)

3 précipitations par 94 % d'acide acétique glacial

3 précipitations fractionnées alcooliques (1 volume + 6 volumes)

dialyse

lyophilisation.

CHAPITRE I

PREPARATION DES POLYOSIDES

Les différents temps de cette préparation sont représentés dans le Schéma I.

Nous étudierons successivement :

- la préparation des bacilles secs
- l'hydrolyse de ces bacilles,
- la purification du polyoside.

PREPARATION DES BACILLES SECS

Les souches ont toujours été entraînées avant d'ensemencer les boîtes de ROUX.

Cet entraînement consiste en un passage sur bouillon, un passage sur gélose nutritive (bouillon de viande peptoné additionné de 1 % de gélose) à partir duquel on isole une colonie typiquement SMOOTH, puis un deuxième passage sur gélose nutritive.

A partir de cette dernière culture, nous ensemençons trois ballons de bouillon de 250 cm³. Après 24 heures à 37°, ces trois ballons vont servir à ensemencer 400 boîtes de ROUX de gélose nutritive.

La culture de 18 h. à 37° est récoltée dans la solution physiologique (Na Cl 0,9 %) ; il faut environ 10 cm³ pour chaque boîte de ROUX. Après centrifugation, les culots sont lavés deux fois par un même volume de solution physiologique (500 cm³), puis trois fois par un

même volume d'acétone (500 cm³) en centrifugeant et en remettant le culot en suspension.

Après la dernière centrifugation, nous avons soin de disperser le culot le long des parois du pot à centrifuger afin d'éviter la formation d'une masse compacte et dure. Après évaporation de l'acétone et dessiccation pendant une nuit sous une cloche en présence de chlorure de calcium, nous obtenons une poudre fine que nous tamisons à travers une gaze pour en éliminer les déchets de gélose.

Les bacilles récoltés sur 400 boîtes de ROUX donnent environ 50 grammes de bacilles secs.

HYDROLYSE DES BACILLES

47 à 60 grammes de bacilles secs sont hydrolysés trois fois pendant 1 h. 30 par un litre d'acide acétique décinormal.

Les bacilles secs sont mis en suspension dans 900 cm³ d'eau distillée chauffée à 90°. Après addition de 100 cm³ d'une solution normale chaude d'acide acétique, nous maintenons 1 h. 30 dans un bain-marie bouillant sous un réfrigérant ascendant ; après refroidissement du ballon sous l'eau courante, nous centrifugeons. Le surnageant est conservé et le culot repris dans 720 cm³ d'eau à 90° ; nous ajoutons 80 cm³ d'une solution normale d'acide acétique chaud, nous portons à nouveau au bain-marie 1 h. 30 et nous procédons de même une troisième fois pour achever l'extraction.

Les trois surnageants recueillis au cours de ces opérations sont séparément évaporés à sec sous vide à une température voisine de 55°. Les résidus sont repris dans 150 ou 100 cm³ d'eau distillée (suivant qu'il s'agit du premier hydrolysate ou des suivants) et, après élimination de l'insoluble par centrifugation, conservés à + 4°.

PURIFICATION DES BACILLES

La première purification consiste en 6 précipitations alcooliques fractionnées entre 50 et 86 % d'alcool.

Les trois hydrolysats sont réunis et additionnés d'un égal volume d'alcool qui précipite les impuretés.

Après une nuit à + 4°, le précipité obtenu est éliminé et le surnageant additionné de 5 nouveaux volumes d'alcool, ce qui porte la concentration en alcool à 86 % et provoque la précipitation du polyside.

Après une nuit à la température du laboratoire, nous centrifugeons ; le précipité est repris par 100 cm³ d'eau distillée. Nous effectuons ainsi 5 nouvelles précipitations fractionnées entre 1 et 6 volumes d'alcool (soit 50 à 86 %).

A partir de la troisième précipitation, nous devons aider la formation du précipité en ajoutant de petites quantités d'acétate de sodium et en frottant la paroi avec une baguette de verre.

Après la sixième précipitation alcoolique, le précipité est repris dans 25 cm³ d'eau distillée et précipité trois fois par 94 % d'acide acétique glacial. Nous faisons encore trois précipitations fractionnées alcooliques entre 50 et 86 %.

Le polyside précipité est repris dans 25 cm³ d'eau bidistillée, dialysé contre de l'eau bidistillée et lyophilisée.

°

°

°

Le Tableau III montre que le rendement de ces 6 préparations est assez constant oscillant entre 1,44 et 1,92 %.

TABLEAU III

RENDEMENT DES DIFFERENTES SOUCHES EN POLYOSIDE

Souches	Grammes de bacilles utilisés	Grammes de polyosides obtenus	Rendement %
T. 556 W V (1)	51	0,980	1,92
T. 556 W (2)	47	0,675	1,44
T. 415 W (2)	50	0,955	1,91
T. 35.52 (3)	60	1,02	1,7
T. 1300 W V (1)	52	0,810	1,55
T. 1470 W V (1)	48	0,720	1,5

(1) souches contenant les antigènes O, H et Vi

(2) souches contenant les antigènes O et H

(3) souche contenant l'antigène O seul.

CHAPITRE II

ETUDE CHIMIQUE DU POLYOSIDE PURIFIE

Afin de nous assurer de la pureté de nos six préparations de polyosides, nous avons dosé l'azote qu'elles contenaient par la méthode de KJELDAHL.

Puis, parmi les cinq sucres constitutifs (glucose, galactose, mannose, rhamnose et tyvélose ou 3.6 didésoxy D mannose [13]), nous avons dosé le rhamnose sur lequel nous désirions baser notre dosage de l'antigène O.

DOSAGE DE L'AZOTE

Nous avons utilisé la technique de Microkjeldahl, telle qu'elle est décrite par STAUB et COMBES [32].

Le catalyseur utilisé pour les minéralisations est une solution aqueuse saturée de sulfate de potassium additionnée de 0,5 % de sulfate de cuivre. Le distillat est recueilli dans 5 cm³ d'une solution aqueuse à 2 % d'acide borique qui retient l'ammoniaque et permet un dosage direct par l'acide chlorhydrique N/70 (dont 1 cm³ correspond à 20 µg d'azote).

Ce dosage est effectué en présence du colorant mixte de MA et ZUAZAGA [23] 5 volumes d'une solution alcoolique à 0,1 % de vert de bromocrésol pour un volume d'une solution alcoolique à 0,1 % de rouge de méthyle.

Les six polyosides ne contiennent que de très faibles quantités d'azote :

0,3 à 0,4 % (Tableau VII cf.p.35) tout à fait comparables à celles trouvées (0,2 - 0,4 %) par G. FREEMAN [14] et PON et STAUB [36]. Leur degré de pureté est donc identique à celui des préparations obtenues par ces auteurs.

DOSAGE DU RHAMNOSE

Nous avons utilisé la technique de DISCHE et SHETTLES [6].

C'est une méthode générale de dosage des sucres contenant plus de 4 C. Le principe en est le suivant : en présence d'acide sulfurique concentré chaud, les sucres donnent du furfural ou des homologues de ce corps. Si on ajoute de la cystéine à ce mélange, elle se combine avec le furfural ou ses homologues et donne des produits colorés, différents suivant le sucre utilisé et dont le spectre d'absorption est spécifique. Pour le phamnose et les méthylpentoses, le produit coloré final présente un maximum d'absorption à 3.960 Å. Pour les hexoses présents dans le polyside, le spectre d'absorption du produit coloré final, quoique beaucoup plus faible, n'est pas nul, mais son maximum est situé entre 3.960 Å et 4.300 Å de telle sorte que la différence d'absorption entre ces longueurs d'onde est nulle. Elle est, au contraire, très grande pour le produit coloré provenant du rhamnose. Son dosage, basé sur la différence d'absorption entre 3.960 Å et 4.300 Å ($\Delta = E_{3.960} - E_{4.300}$) n'est donc pas gêné par la présence des hexoses.

Le tyvelose (3.6 didésoxy D mannose) ne donne pas de produit coloré dans les conditions de ce dosage [39].

Cette technique est d'une grande sensibilité : elle permet de doser avec précision et fidélité quelques μg de rhamnose, à condition de travailler avec un acide sulfurique très pur (seul l'acide MERCK nous a donné satisfaction) et d'effectuer la réaction du rhamnose avec cet acide à une température et pendant un temps rigoureusement constants.

Nous avons suivi exactement les détails de technique donnés par DISCHE et SHETTLES et nous avons toujours joint aux tubes du dosage une gamme de rhamnose afin de se rapporter à des étalons traités exactement dans les mêmes conditions.

Nos résultats sont, d'ailleurs, toujours très concordants et le Δ ($E_{3.960}$ - $E_{4.300}$) fourni par 1 μ g de rhamnose est toujours compris entre 19 et 20 (Tableau IV).

TABLEAU IV
DIFFERENTES VALEURS DE Δ (E_{3960} - E_{4300})
FOURNIES PAR 1 μ g DE RHAMNOSE DANS NOS DOSAGES

	Δ (E_{3960} - E_{4300})
N°1	19,2
N°2	19,6
N°3	19
N°4	19,8
N°5	20

Nous opérons dans des tubes à essai en pyrex de même épaisseur, lavés par du mélange sulfochromique ; nous refroidissons dans un bain-marie à 0°, 4,5 cm³ d'un mélange de 1 volume d'eau et de 6 volumes d'acide sulfurique ; puis, nous ajoutons, sans mélanger, 1 cm³ (ou moins) de la solution contenant 5 à 20 μ g de rhamnose.

Nous complétons à 5,5 cm³, s'il y a lieu, avec de l'eau bidistillée. Un tube témoin contient 1 cm³ d'eau bidistillée et les 3 tubes étalons 5, 10 et 15 μ g de rhamnose (+).

Nous mélangeons alors les deux phases doucement mais soigneusement en opérant toujours dans un bain d'eau à 0° afin d'éviter tout échauffement. Après quelques minutes à la température du laboratoire, les tubes sont plongés exactement dix minutes dans un bain-marie qui doit bouillir régulièrement et ne pas s'arrêter lorsque nous ajoutons les tubes.

(+) - Nous conservons à 4° une solution de rhamnose contenant 1 μ g/cm³ et 1/5.000 de merthiolate. Cette solution est diluée extemporanément avec de l'eau bi-distillée avant chaque dosage.

Le merthiolate est alors assez dilué pour ne pas perturber le dosage.

Nous refroidissons et nous ajoutons 0,1 cm³ d'une solution aqueuse de chlorhydrate de cystéine (solution à 0,3 %).

Nous agitons bien et nous obtenons une très faible coloration jaune verdâtre qui demeure sans changement pendant vingt-quatre heures. Nous dosons au spectrophotomètre (+) entre deux heures et 24 heures après l'addition de cystéine.

Pour les dosages, nous avons toujours travaillé avec 0,5 et 1 cm³ de la solution à doser et recommencé le dosage si les deux chiffres n'étaient pas concordants (ce qui était très rare). Le tableau V donne le protocole exact de l'un de nos dosages.

Ces dosages ont montré que :

les polyosides extraits des souches T.556 W V, T.556 W, T.35.52 et T.1470 W V contenaient exactement 20 % de rhamnose, celui extrait de la souche T.1300 W V, 20,5 % et celui extrait de la souche T.415 W, 18,5 % (Tableau VII cf. p. 33).

Ces chiffres égaux ou très voisins de 20 % sont les mêmes que ceux donnés par PON et STAUB [36] pour le polyoside non lyophilisé et par STAUB et TINELLI [37] pour le polyoside lyophilisé.

°
° °

Ces analyses chimiques montrent donc que, quelle que soit la composition antigénique de la souche de S.typhi utilisée, le polyoside est toujours obtenu dans le même degré de pureté (0,2 à 0,4 % d'azote) et sa teneur en rhamnose est toujours proche de 20 %.

(+) - Nous avons toujours utilisé un spectrophotomètre de COLEMAN.

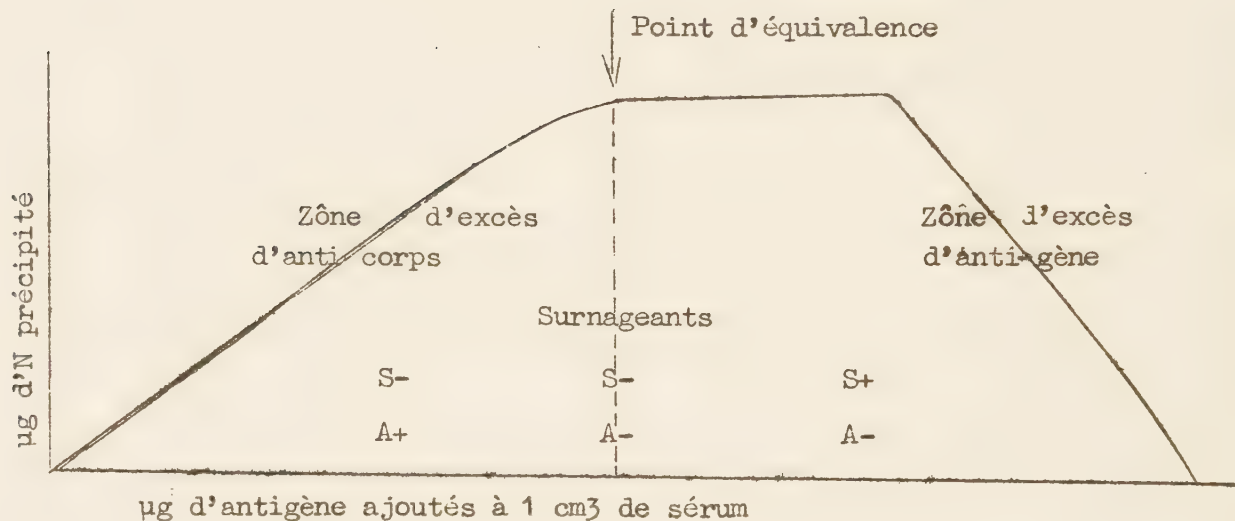
TABEAU V

PROTOCOLE TYPE D'UN DOSAGE DE RHAMNOSE

Solution dosée	E 3960	E 4300	$\Delta (- T)$	μg de rhamnose pour 1 cm^3
Témoin (E distillée 1 cm^3) (T)	17	11	0	Etalons
Rhamnose 5 μg	123	17	100	
" 10 μg	221	17	198	
" 15 μg	324	21	297	
" 1 μg	(calculé)		19,8	
Solution N° 1				2,5
0,5 cm^3	47	17	24	
1 cm^3	77	24	47	
Solution N° 2				2
0,5 cm^3	39	13	20	
1 cm^3	65	19	40	

FIGURE 1

COURBE THEORIQUE DE LA PRECIPITATION D'UN SERUM
PAR DES QUANTITES CROISSANTES D'ANTIGENE



La quantité d'anticorps précipités croît avec la quantité d'antigène ajoutée ; elle atteint un maximum quand tous les anticorps du sérum sont précipités ; après un plateau plus ou moins long, elle décroît dans la zone d'excès d'antigène par suite de la formation de complexes antigène-anticorps solubles.

CHAPITRE III

ETUDE IMMUNOCHIMIQUE DU POLYOSIDE PURIFIE

Ayant ainsi constaté que nos six polyosides contenaient des quantités très voisines de rhamnose, nous avons voulu nous assurer de leur identité immunologique.

PRINCIPE DE CETTE ETUDE

On sait que des haptènes polyosidiques identiques précipitent à poids égal la même quantité d'anticorps d'un sérum donné, quelle que soit la proportion antigène-anticorps utilisée [20]. Les courbes des quantités d'anticorps précipités en fonction des quantités d'antigène ajoutées au sérum sont toutes identiques.

HEIDELBERGER et KENDALL ont montré que ces courbes avaient toujours l'allure de celle dessinée sur la fig.1 : la quantité d'anticorps précipités croît avec la quantité d'antigène ajoutée (zone d'excès d'anticorps), elle atteint un maximum quand tous les anticorps présents dans le sérum sont précipités (point d'équivalence) et s'y maintient pendant un temps plus ou moins long quand on continue à augmenter les quantités d'antigène (excès d'antigène), puis elle redescend par suite de la formation de complexes antigène-anticorps solubles. On peut déterminer la quantité d'antigène correspondant au point d'équivalence, au moyen de l'étude des "surnageants" obtenus après centrifugation du précipité spécifique dans les divers mélanges antigène-sérum, dans notre cas polyoside-sérum.

Les surnageants de chacun des précipités sont mis en contact, d'une part, avec du sérum, d'autre part avec une solution de polyoside. Nous opérons dans des tubes étroits en ayant soin de superposer les deux liquides sans les mélanger. A la surface de séparation, il se forme un disque de précipité (ring. test). Si la précipitation s'est faite en présence d'un excès d'anticorps (début de la courbe), l'anneau se produira dans le tube contenant le "surnageant" et le polyoside (S - , A +). Dans la zone d'excès d'antigène, nous verrons l'anneau dans le tube contenant "le surnageant" et le sérum (S + , A -). Le point d'équivalence correspond au tube dont "le surnageant" ne précipite ni avec le polyoside, ni avec le sérum (S - , A -) fig.1 cf. p.26 et Tableau VI).

Pour l'obtention et le lavage des précipités spécifiques, nous avons suivi exactement les détails de la technique de HEIDELBERGER et KENDALL [17] tels qu'ils sont donnés par GRABAR [15].

Dans des tubes à hémolyse, nous mélangeons 0,5 cm³ de sérum à des quantités croissantes de polyoside dissous en solution physiologique merthiolatée (X) ; nous agitons et nous complétons à volume constant (2 ou 2,5 cm³) avec de la solution physiologique merthiolatée. Nous agitons encore et nous laissons à + 4° pendant 48 heures. Nous préparons deux tubes avec chaque quantité d'antigène. Après 48 heures, les tubes sont centrifugés à 4° pendant 10 minutes à 6.000 tours/minute ; le liquide surnageant est gardé pour l'étude des "surnageants" et le précipité remis en suspension dans deux gouttes de solution physiologique. Nous ajoutons ensuite deux fois un centimètre cube de solution physiologique en agitant. Après 10 minutes, les tubes sont centrifugés et nous procédons de la même manière à un autre lavage.

Nous effectuons toutes ces opérations à la glacière pour éviter tout échauffement.

(X) - Sérum et antigène doivent être centrifugés à froid avant d'être utilisés.

TABLEAU VI

COURBES DE PRECIPITATION DU SERUM ANTITYPHIQUE

DE CHEVAL N° 834 PAR LES DIFFERENTS

POLYOSIDES

µg de polyoside ajoutés à 0,5 cm3 de sérum	µg d'azote précipités de 0,5 cm3 de sérum	surnageant		µg d'azote précipités de 0,5 cm3 de sérum	surnageant	
		S (I)	A (2)		S	A
	Polyoside T. 556 W V			Polyoside T. 556 W		
4	20			22		
5	45	-	+	45	-	+
10	100	-	+	101	-	+
20	154	-	-(3)	150	-	-
30	158	+	-	161	+	-
40	162	+	-	170	+	-
	Polyoside T. 415 W			Polyoside T. 35.52		
4	21			25		
5	48	-	+	50	-	+
10	96	-	+	100	-	+
20	147	-	-	154	-	-
30	159	+	-	166	+	-
40	170	+	-	173	+	-
	Polyoside T.1300 W V			Polyoside T.1470 W V		
4	20			24		
5	30	-	+	41	-	+
10	96	-	+	97	-	+
20	154	-	-	152	-	-
30	159	+	-	158	+	-
40	165	+	-	165	+	-

(1) - Le "surnageant" est mis en présence du sérum.

(2) - Le "surnageant" est mis en présence d'antigène.

(3) - Point d'équivalence.

HEIDELBERGER et KENDALL dosaient les anticorps précipités au moyen de l'azote du précipité obtenu dans chaque tube dont ils soustrayaient la quantité d'azote correspondant à l'antigène utilisé. Nous avons dosé l'azote protéique de nos précipités spécifiques au moyen du Biuret suivant la technique recommandée par MAC DUFFIE et KABAT [25]. Cet azote protéique appartient entièrement aux anticorps puisque nos antigènes polysidiques n'en contiennent pas.

Les précipités lavés sont dissous dans 1 cm³ de soude N/5, laissés une à deux heures à la température du laboratoire afin d'assurer leur dissolution totale, puis, additionnés de 1 cm³ de réactif cupro-tartrique alcalin de WEICHSELBAUM (formule (°) modifiée par DITTEBRAUNDT [8]. Après 30 minutes à 37°, nous lisons l'absorption à 555 mμ au photolorimètre de BONET-MAURY.

RESULTATS

Nous avons utilisé le sérum de cheval anti S.Typhi N°834 préparé par STAUB et COMBES [32].

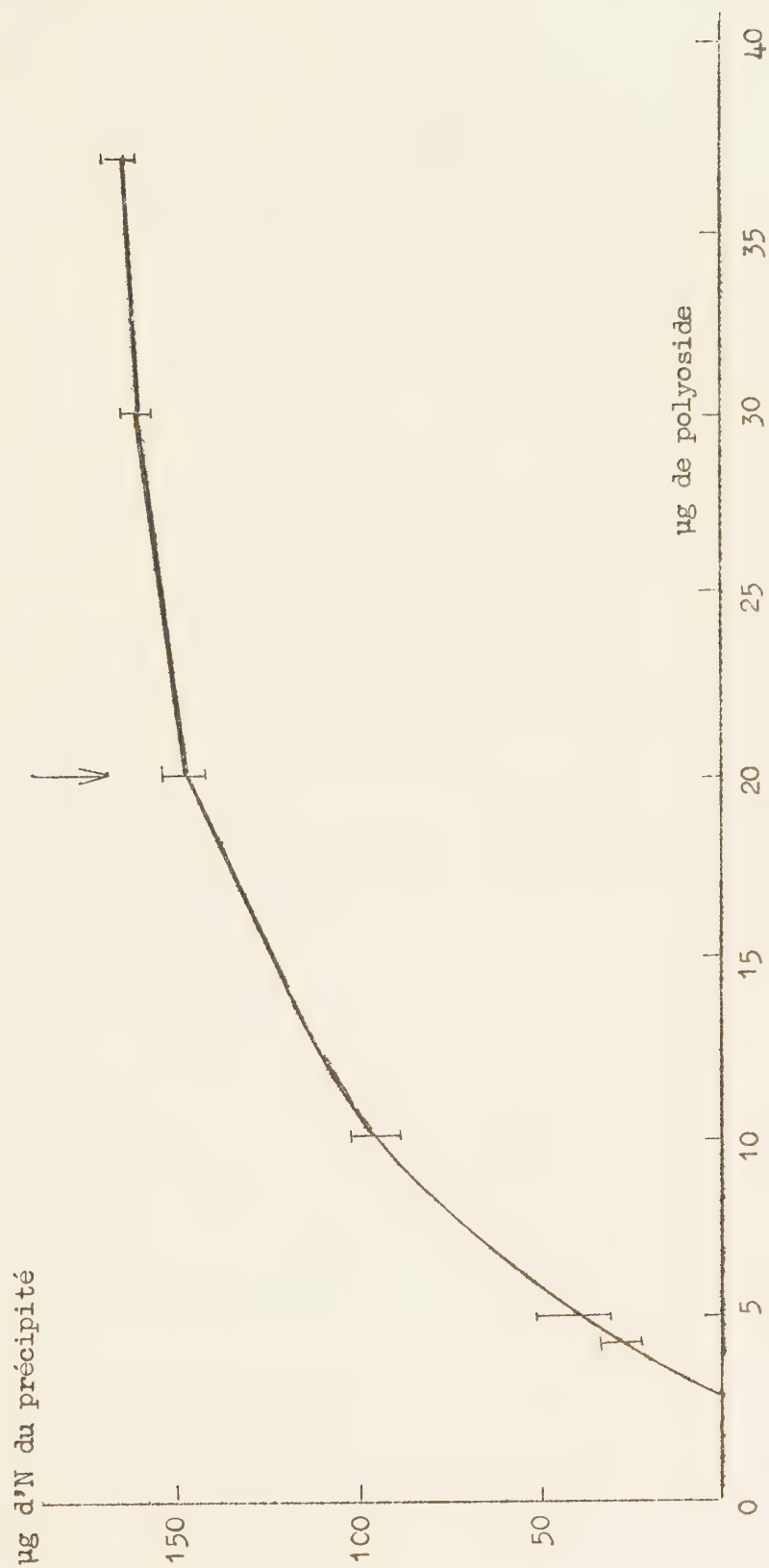
Le cheval avait reçu une série d'injections de suspensions de la souche H 901 quand STAUB et COMBES ont commencé à l'injecter avec la souche O 901 ; il contenait déjà une petite quantité de précipitines anti O. Il reçut alors 8 injections intraveineuses de 20 cm³ d'une suspension de bacilles O 901 tués par le chauffage de 1 heure au bain-marie à 100° suivant le protocole ci-après :

(°) Formule du Réactif :

Tartrate de sodium et de potassium	:	9 g
Sulfate de cuivre 5 H ₂ O	...	3 g
Iodure de potassium	...	5 g
Soude 0, 2 N	q. s. p.	1.000 g

FIGURE 2

COURBES DE PRECIPITATION DE 0,5 CM³ DU SERUM ANTISALMONELLA
TYPHI N° 834 PAR LES DIFFERENTS POLYOSIDES



Les traits verticaux indiquent l'étalement des valeurs expérimentales portées dans le tableau VI.
 ↓ point d'équivalence.

28 Février :	4 milliards de bacilles,		
6 Mars :	8 milliards	"	
8 Mars :	20	"	"
15 Mars :	40	"	"
17 Mars :	80	"	"
22 Mars :	140	"	"
24 Mars :	280	"	"
27 Mars :	420	"	"

Au cours de l'immunisation, le taux des précipitines O a augmenté considérablement ; il atteint 170 μ g d'azote d'anticorps dans la saignée finale qui eut lieu le 4 Avril 1950. C'est cette saignée qui nous a fourni le sérum utilisé dans tous nos essais. Recueilli stérilement et filtré sur bougie, il est conservé à + 4° en ampoules scellées en présence de merthiolate à raison de 1/5.000.

Nous avons toujours travaillé avec 0,5 cm³ de sérum.

Les résultats consignés sur le tableau VI cf p.29 montrent que .

40 μ g de polyoside précipitent	167	$\pm$	5 μ g d'azote d'anticorps		
30 " " "	162	$\pm$	4 μ g	"	"
20 " " "	150,5	$\pm$	3,5 μ g	"	"
10 " " "	98,5	$\pm$	2,5 μ g	"	"
5 " " "	40	$\pm$	10 μ g	"	"

On voit que les résultats coïncident aux erreurs d'expérience près (2 ou 3 %) sauf pour 5 μ g de polyoside. Pour ce dernier point, nous sommes sur la partie très fortement ascendante de la courbe (fig.2) et de très petites erreurs de pipetage, dans les quantités d'antigène utilisées, peuvent aboutir à de grands écarts dans les anticorps précipités.

Le tableau VI cf. p.29 montre, d'autre part, que 20 μ g de chacun des polyosides sont nécessaires et suffisants pour précipiter la totalité des anticorps antipolyosidiques contenus dans 0,5 cm³ du sérum anti S.typhi utilisé.

o

o

o

Les six polyosides sont donc identiques du point de vue immunologique.

TABLEAU VII

CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS POLYOSIDES

Souches ayant fourni le polyoside	Azote %	Rhamnose %	µg de polyoside précipitant les anticorps de 0,5 cm ³ de sérum au point d'équivalence
T 556 W V	0,3	20	20
T 556 W	0,3	20	20
T 415 W	0,4	18,5	20
T 35.52	0,4	20	20
T 1300 W V	0,3	20,5	20
T 1470 W V	0,3	20	20

CONCLUSION DE LA PREMIERE PARTIE

Les six polyosides purifiés sont, comme le montre le Tableau VII, chimiquement et immunologiquement identiques, que la souche de départ contienne l'antigène O seul ou accompagné des antigènes H et Vi.

La proportion de rhamnose dans ces polyosides est toujours très proche de 20 %.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHE D'UNE TECHNIQUE
PERMETTANT D'OBTENIR DES EXTRAITS
CONTENANT DES POLYOSIDES
IDENTIQUES ENTRE EUX
ET IDENTIQUES AU POLYOSIDE PURIFIE

STAUB et COMBES ont dosé le polyoside dans des extraits où il avait subi des purifications beaucoup moins poussées que celles du chapitre précédent. Nous avons donc recherché si ces polyosides "bruts" contenaient constamment 20 % de rhamnose. A cet effet, nous avons déterminé la teneur en polyoside des extraits par le titrage immunochimique de STAUB et COMBES et dosé le rhamnose par la méthode de DISCHE et SHETTLES. Ceci fera l'objet du premier chapitre.

Après avoir constaté que les polyosides "bruts" contenaient des quantités variables de rhamnose, nous avons, dans un deuxième chapitre, essayé de trouver d'où provenait cette différence avec le polyoside purifié étudié dans la première partie.

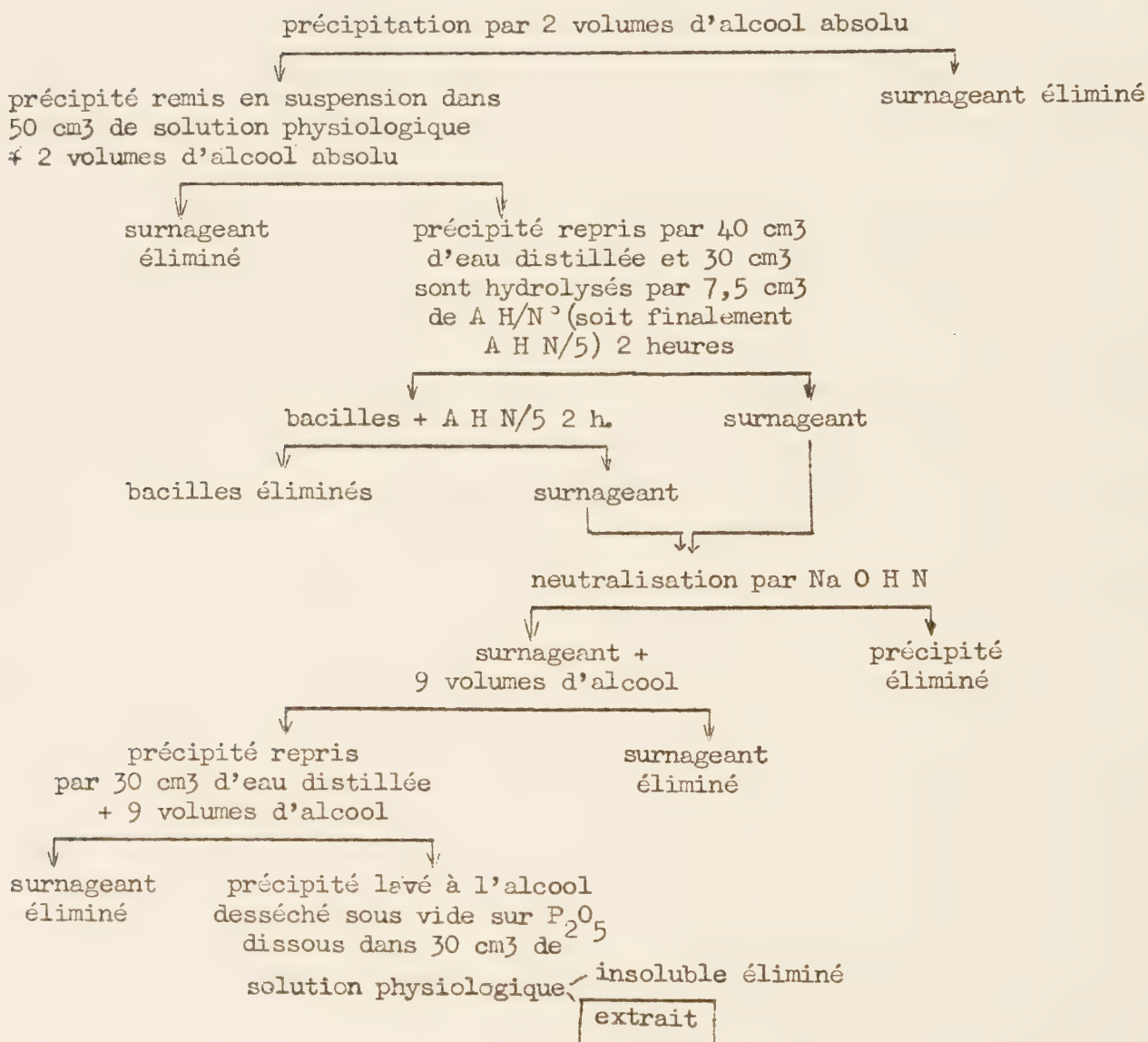
Enfin, nous basant sur ces derniers résultats, nous avons recherché les moyens d'obtenir des polyosides "bruts" contenant toujours 20 % de rhamnose. Cette étude constituera le troisième chapitre.

SCHEMA 2

SCHEMA DE LA PREPARATION DES EXTRAITS

CONTENANT LE POLYOSIDE "BRUT"

425 mg de bacilles secs dans 50 cm³ de sol.physiologique
(ou 8 mg,5 / cm³ c'est-à-dire environ 50 milliards de
bacilles/cm³).



CHAPITRE I

ETUDE DES POLYOSIDES "BRUTS" PRESENTS

DANS LES EXTRAITS DE STAUB ET COMBES

PREPARATION DES EXTRAITS

Cette préparation est résumée sur le schéma 2. Elle présente quelques différences avec la technique utilisée pour obtenir le polyside purifié (schéma I cf. p. 16).

Le lavage des bacilles ne se fait plus simplement au moyen de solution physiologique qui entraîne en solution une quantité non négligeable de l'antigène O, mais par deux précipitations alcooliques à 66 % (deux volumes pour un volume de suspension microbienne). A cette concentration, l'antigène O dissous dans la solution physiologique qui a servi à récolter les bacilles, est précipité, en même temps que ceux-ci, tandis que les impuretés provenant de la gélose nutritive restent en solution [33].

L'hydrolyse se fait en deux fois, pendant deux heures, avec une solution N/5 d'acide acétique, ces conditions ayant été trouvées optima pour l'extraction de la totalité du polyside spécifique [32].

La purification du polyside a été limitée à la neutralisation de l'extrait qui élimine déjà une partie des protéines : deux précipitations alcooliques à 90 % (9 volumes d'alcool), dessiccation du dernier précipité et élimination des insolubles après la première précipitation alcoolique et la dessiccation. Ces différents temps permettent d'éliminer ou de dénaturer suffisamment les protéines pour qu'elles ne puissent plus précipiter les

sérums anti S.typhi. La précipitation de ces sérums par de tels extraits est tout à fait semblable à celle obtenue avec le polyside purifié, ce qui importait pour le dosage immuno-chimique utilisé par STAUB et COMBES.

Nous avons travaillé avec les souches T.556 W, T.J07, T.1300 W V, T.1470 W V, T.415 W, T. 35.52.

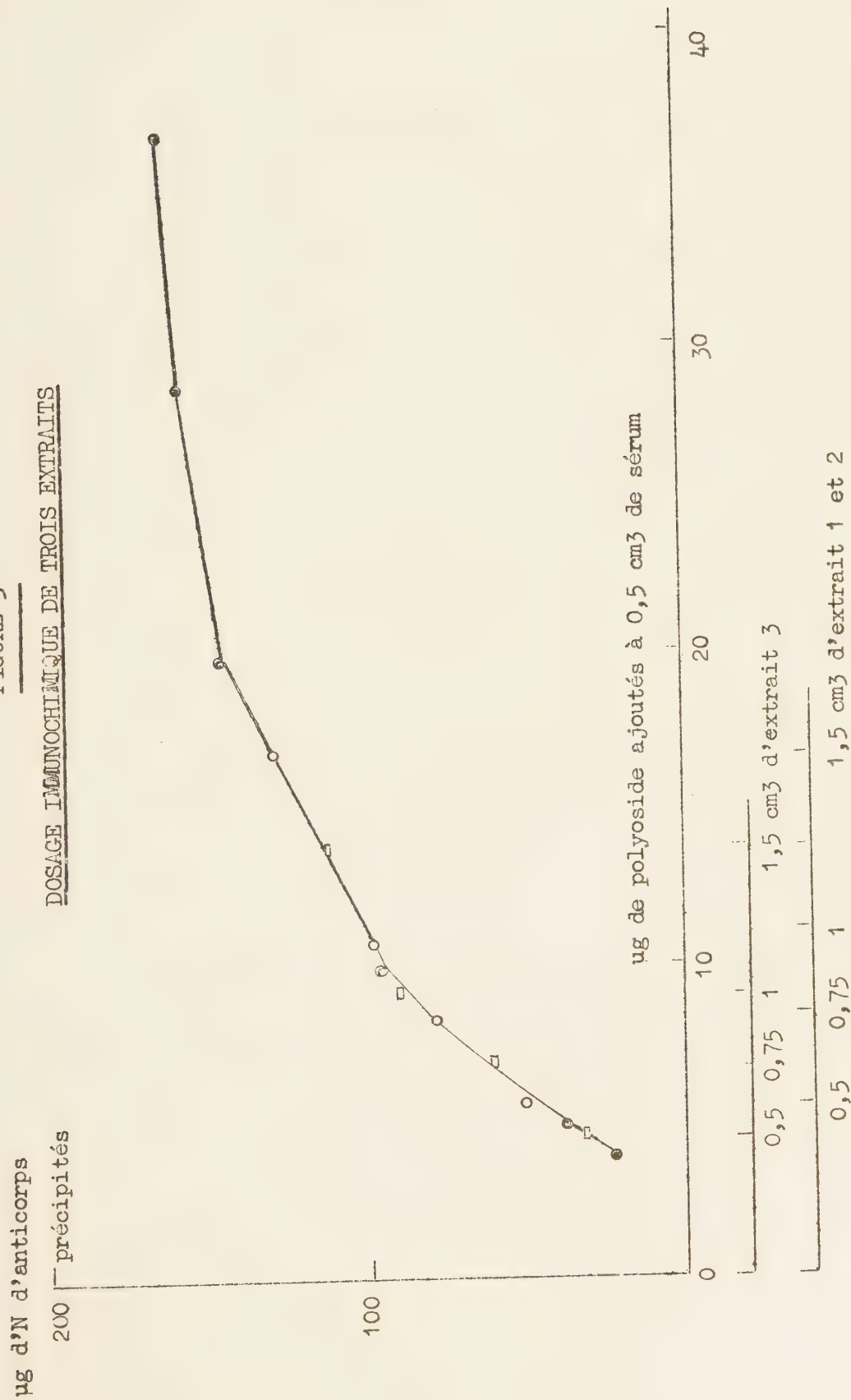
Comme pour la préparation du polyside purifié, chaque souche a toujours été entraînée (cf. p.17) avant de servir à ensemençer les deux boîtes de ROUX dont la récolte par 50 cm³ de solution physiologique, après 18 h. à 37°, nous fournit les bacilles de l'extrait.

La concentration des bacilles de cette suspension (qui doit être comprise entre 50 et 80 milliards par cm³) est vérifiée au moyen de son opacité lue au photomètre de MEUNIER et rapportée à une courbe de référence. La suspension est alors précipitée par deux volumes d'alcool absolu ; après quelques heures à la température du laboratoire et centrifugation, le précipité est repris dans 50 cm³ de solution physiologique et traité pareillement une deuxième fois. Ce second précipité est remis en suspension dans 40 cm³ d'eau distillée ou dans la quantité correspondant à une concentration voisine de 50 milliards de bacilles par cm³. 30 cm³, exactement mesurés, sont additionnés de 7,5 cm³ d'acide acétique normal et maintenus 2 heures dans un bain-marie bouillant sous un réfrigérant ascendant ; après refroidissement du ballon sous l'eau courante, la suspension est centrifugée ; le "surnageant" est conservé à la glacière et les germes hydrolysés une deuxième fois dans les mêmes conditions.

Les deux "surnageants" sont alors réunis et neutralisés par de la soude normale ; il se forme un précipité qui est éliminé et le "surnageant" est précipité par 9 volumes d'alcool absolu. Après 15 heures à la température du laboratoire, nous centrifugeons ; le précipité dissous dans 30 cm³ d'eau distillée est centrifugé pour éliminer l'insoluble et précipité une seconde fois par 9 volumes d'alcool ; ce précipité est lavé par l'alcool (2 fois par 100 cm³) et desséché sous vide sur P₂O₅. Nous le reprenons dans exactement 30 cm³ de solution physiologique en sorte que 1 cm³ corresponde à 1 cm³ de suspension microbienne de départ.

FIGURE 3

DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE DE TROIS EXTRAITS



DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE DU POLYOSIDE DANS LES EXTRAITS

Ayant obtenu ces extraits, nous avons déterminé leur teneur en polyoside par le dosage immunochimique selon la technique de STAUB et COMBES.

Ce dosage repose sur le principe émis au début du précédent chapitre et maintes fois utilisé en immunochimie [20] : deux haptènes identiques précipitent à poids égal la même quantité d'anticorps d'un même sérum. En utilisant des quantités d'extraits telles que les anticorps soient en excès, l'azote protéique des précipités spécifiques se place sur la portion ascendante de la courbe et il est facile d'en déduire la quantité de polyoside contenue dans l'extrait.

Nous avons utilisé le sérum anti S.Typhi N°834 du précédent chapitre et rapporté les précipités obtenus avec les extraits à la courbe étalon établie avec les polyosides purifiés (fig.3 cf.p.41) en suivant tous les détails de techniques décrits page 28.

Ces dosages immunochimiques ont donné, pour les 6 souches étudiées, les valeurs portées sur le tableau VIII.

TABLEAU VIII

TENEUR EN POLYOSIDE ET EN RHAMNOSE DES DIFFERENTS EXTRAITS

Souche ayant fourni l'extrait	µg de polyoside par cm ³ d' extrait (1)	µg de rhamnose par cm ³ d'extrait (2)	% de rhamnose dans le polyo- side "brut"	% de rhamnose dans le polyo- side purifié
T. 556 W	570	130	23	20
T.J 07	400	85	21	
T. 1300 W V	580	158	27	20,5
T. 1470 W V	460	125	27	20
T. 415 W	335	83	24	18,5
T. 35.52	240	63	26	20

(1) - dosé par immunochimie

(2) - dosé par la technique de DISCHE et SHETTLES.

DOSAGE DU RHAMNOSE DANS LES EXTRAITS ET TENEUR DES POLYOSIDES "BRUTS" EN CE SUCRE

Nous avons dosé le rhamnose dans ces mêmes extraits suivant la technique de DISCHE et SHETTLES (cf. p. 22) et déduit de ces valeurs la teneur en rhamnose des polyosides "bruts" présents dans ces extraits.

On voit sur le tableau VIII (cf. p. 42) que, contrairement à ce qui se passe avec les polyosides purifiés, la teneur en rhamnose des polyosides "bruts" n'est pas constante : toujours supérieure aux 20 % des polyosides purifiés, elle varie de 21 à 27 % bien que ces polyosides "bruts" aient été extraits précisément des souches qui nous avaient fourni les polyosides purifiés.

°

° °

En conclusion, les polyosides "bruts", présents dans les extraits, ne semblent pas identiques au polyoside purifié préparé selon la technique de FREEMAN. Contrairement à celui-ci, leur teneur en rhamnose dosée par la technique de DISCHE et SHETTLES varie d'un polyoside à l'autre. Il est donc impossible de baser un dosage de polyoside sur le dosage du rhamnose dans les extraits.

Le Tableau IX montre les erreurs inhérentes à un tel dosage (prenant comme base de calcul 20 % de rhamnose comme dans le polyoside purifié) ; ces erreurs varient de 3,8 à 36 %.

TABLEAU IX

COMPARAISON ENTRE LES QUANTITES DE POLYOSIDES
OBTENUES PAR DOSAGE DU RHAMNOSE ET PAR L'IMMUNOCHIMIE

Souche ayant servi à préparer l'extrait	µg de rhamnose par cm ³ d'extrait	µg de polyoside par cm ³ d'extrait		
		calculé d'après la teneur en rhamnose de l'extrait (1)	dosé par immunochimie	différence %
T. 556 W	135	675	650	3,8
T. J07	85	425	400	6,2
T. 1300 W V	158	790	580	36,2
T. 1470 W V	125	625	460	35,8
T. 415 W	83	415	335	23
T. 35.52	63	315	240	35

(1) - Dans ce calcul, on a supposé la teneur en rhamnose constante et égale à 20 % comme dans le polyoside purifié.

CHAPITRE II

ETUDE DES CONDITIONS SUSCEPTIBLES DE CAUSER DES DIFFERENCES

ENTRE LE POLYOSIDE PUR ET LE POLYOSIDE "BRUT"

Nous avons vu, au début du précédent chapitre, que les techniques utilisées pour obtenir le polyoside pur et celui présent dans les extraits n'étaient pas exactement les mêmes. Le Tableau X rappelle ces différences.

Afin de nous rendre compte s'il était possible d'obtenir des extraits contenant un polyoside à 20 % de rhamnose, nous avons étudié systématiquement l'influence de chacune des différences de technique en travaillant, soit avec le polyoside purifié, soit avec le polyoside "brut" des extraits.

Nous étudierons donc, successivement, l'importance du mode de lavage des bacilles, des conditions d'hydrolyse, des précipitations alcooliques et de la dialyse finale sur la teneur en rhamnose du polyoside "brut" ; puis celle de la précipitation acétique sur la teneur en rhamnose du polyoside purifié.

TABEAU X

DIFFERENCE ENTRE LES TECHNIQUES UTILISEES POUR LES PREPARATIONS DES POLYOSIDES PURIFIES ET DES POLYOSIDES PRESENTS DANS LES EXTRAITS

Polyoside purifié	Extrait
Bacilles lavés 2 fois par la solution physiologique et desséchés par l'acétone	Bacilles en suspension dans la solution physiologique précipités par 2 volumes d'alcool
Hydrolyse N/10 1h. 30	Hydrolyse N/5 2 h.
Précipitations alcooliques fractionnées entre 1 et 6 volumes d'alcool	Précipitation totale par 9 volumes d'alcool
Précipitation par l'acide acétique glacial	Pas de précipitation
Dialyse	Pas de dialyse

PREPARATION DU POLYOSIDE "BRUT" AVEC DES BACILLES LAVES
PAR LA SOLUTION PHYSIOLOGIQUE

Quatre boites de ROUX ont étéensemencées avec la souche T.1470 W V entraînée par les trois passages habituels. Après dix-huit heures de culture à 37°, les bacilles de deux boites ont été traités par l'alcool selon le protocole ordinaire (C Tableau XI, p.47). Les bacilles des deux autres boites, récoltés dans 50 cm³ de solution physiologique, ont été lavés deux fois par 30 cm³ de la même solution (A Tableau XI, p.47).

Les eaux de lavage réunies ont été précipitées deux fois par deux volumes d'alcool absolu, puis le précipité et les bacilles ont été traités suivant la technique ordinaire (hydrolyse, précipitations alcooliques ...).

Le polyoside et le rhamnose ont été dosés dans chacun des extraits correspondant aux eaux de lavage (B Tableau XI), aux bacilles lavés (A Tableau XI) et à ceux précipités par l'alcool (C Tableau XI).

On voit, sur le Tableau XI (cf. p. 47) que le polyoside des bacilles lavés par la solution physiologique contient moins de 20 % de rhamnose, contrairement à celui des bacilles traités par l'alcool (C) et que, corrélativement, le polyoside contenu dans l'extrait des eaux de lavage contient une très grande proportion de rhamnose (B).

Une autre expérience au cours de laquelle nous n'avons travaillé qu'avec les eaux de lavage nous a donné un polyoside contenant 37 % de rhamnose.

Des courbes d'absorption sur la substance que nous titrions dans les eaux de lavage (fig.4, courbes 1 et 2) ont montré que c'était bien du rhamnose.

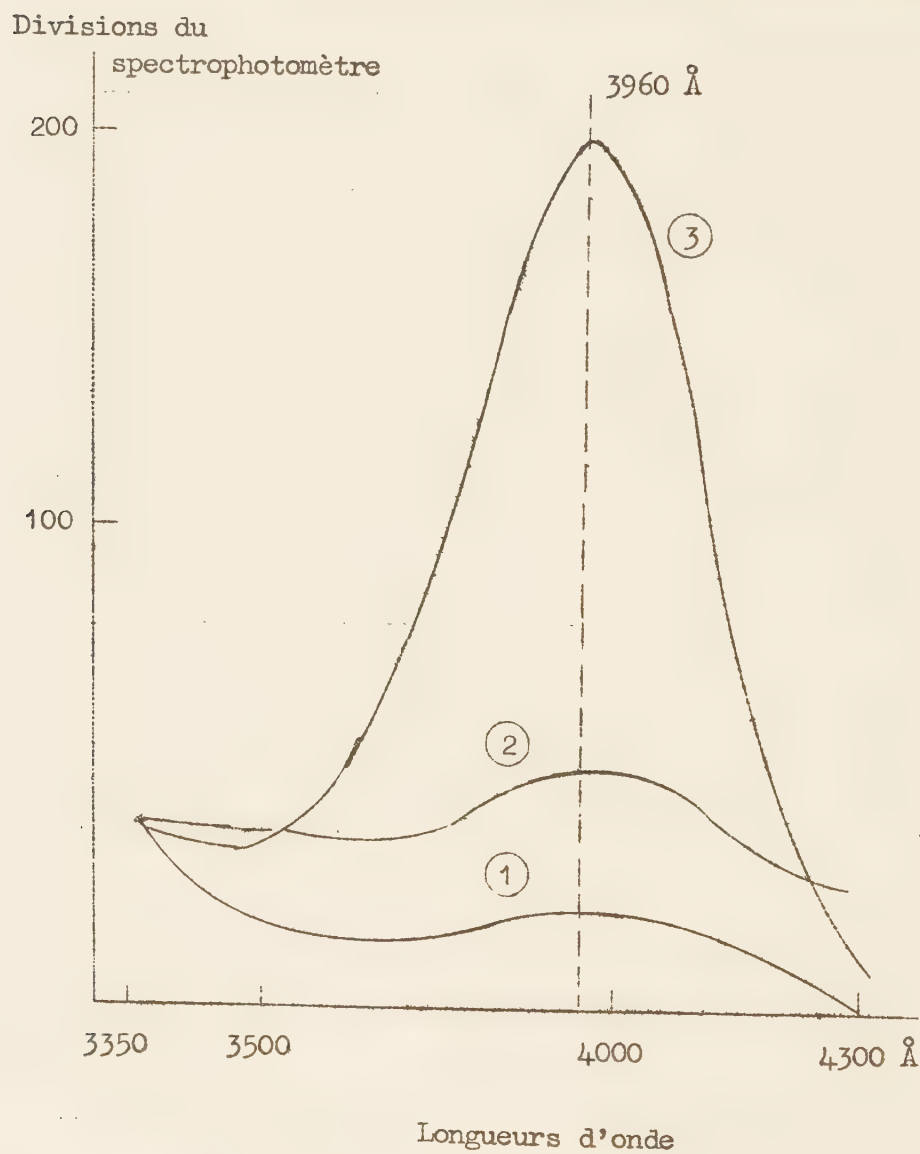
TABLEAU XI

INFLUENCE DES DIFFERENTS TEMPS DE
LA PREPARATION SUR LE % DE RHAMNOSE CONTENU DANS LE
POLYOSIDE "BRUT" OU PURIFIE

Souche ayant fourni le polyoside	Mode de Préparation		% de Rhamnose
	Purification Schéma 1 sauf	"Brut" Schéma 2 sauf	
T.I.470 W V		Bacilles lavés A	19
		Eaux de lavage B	50
		Ordinaire C	22
T.I.300 W V		Hydrolyse 1h.30 N/10 D	24
		Hydrolyse 2h. N/5 E	27
T.I.300 W V		Précipit. totales par 9 volumes d'alcool F	23
		Précipit. fractionnées par 1 et 6 vol. d'alc. G	23
T.415 W		Dialysé H	24
		Non dialysé I	24
T.35.52		Dialysé H	27
		Non dialysé I	27
T.35.52	sans précipit. acétiques J		23
	avec précipit. acétiques K		20

FIGURE 4

COURBES D'ABSORPTION FAITES AVEC DEUX EXTRAITS PREPARES
A PARTIR DES EAUX DE LAVAGE DE DEUX SOUCHES DE S. TYPHI



1 - première courbe

2 - deuxième courbe

3 - courbe de référence faite avec 10 μ g de rhamnose

PREPARATION DU POLYOSIDE "BRUT"
AVEC DES CONDITIONS D'HYDROLYSE DIFFERENTES

La souche T.1300 W V, entraînée selon la technique habituelle, a été ensemencée sur quatre boîtes de ROUX. Après 18 heures de culture à 37°, récolte et précipitations alcooliques, les bacilles de deux boîtes ont été hydrolysés pendant 2 heures par une solution N/5 d'acide acétique (Tableau XI, E, cf. p.47) et ceux de deux autres boîtes pendant 1 h.30 par de l'acide N/10 (Tableau XI, D, cf. p.47) comme pour la préparation du polyoside purifié. Les deux hydrolysats ont été ensuite traités suivant la technique ordinaire.

Nous avons dosé le polyoside et le rhamnose dans les deux extraits. Les résultats, portés sur le Tableau XI (D et E, cf. p.47) montrent que les conditions d'hydrolyse ne les ont pas modifiés : le polyoside contient toujours plus de 20 % de rhamnose.

PREPARATION DU POLYOSIDE "BRUT" AVEC DES PRECIPITATIONS
FRACTIONNEES PAR 1 et 6 VOLUMES D'ALCOOL

La souche T.1300 W V, traitée selon la méthode ordinaire, a donné un polyoside "brut" contenant 23 % de rhamnose.

Une partie de l'extrait final a été précipitée par 1 et 6 volumes d'alcool, puis nous avons, à nouveau, dosé polyoside et rhamnose.

Les précipitations fractionnées ne changent donc rien à la teneur en rhamnose de l'extrait qui est toujours égale à 23 % (Tableau XI, F et G, cf. p.47).

PREPARATION DU POLYOSIDE "BRUT" AVEC DIALYSE

Les souches T.415 W et T.35.52 ont servi à préparer deux extraits selon la technique normale de STAUB et COMBES. Sur les 30 cm³ d'extrait contenant le polyoside "brut" obtenus à la fin de la préparation, 15 cm³ ont été dialysés.

Mais, que le polyoside "brut" soit soumis ou non à la dialyse, les résultats ont été identiques : il y a toujours une proportion de rhamnose supérieure à 20 % (Tableau XI, H et I, cf. p. 47).

Par ailleurs, comme nous l'avons déjà vu, le polyoside purifié, qu'il soit dialysé [37] ou non [36], contient toujours 20 % de rhamnose.

PREPARATION DU POLYOSIDE PURIFIE SANS PRECIPITATIONS ACETIQUES

La souche T 35.52, entraînée et traitée suivant la technique indiquée p. 17 , a servi à préparer des bacilles secs.

Ils ont été hydrolysés trois fois deux heures par une solution décimormale d'acide acétique ; ces trois hydrolysats, concentrés sous vide, ont été réunis pour subir 5 précipitations fractionnées alcooliques (1 volume - 6 vol.). Le dernier précipité a été repris dans 25 cm³ d'eau distillée ; 15 cm³ ont été traités, comme dans la préparation normale du polyoside purifié, par trois précipitations avec 94 % d'acide acétique et trois précipitations alcooliques fractionnées, afin d'éliminer l'acide, puis dialysés et lyophilisés. Les 10 cm³ restants ont simplement été dialysés et lyophilisés.

Nous avons dosé le rhamnose sur les deux polyosides ainsi obtenus. Les résultats portés sur le Tableau XI (J et K cf. p.47) montrent qu'avant les précipitations acétiques, le polyoside "purifié" contient une proportion plus forte de rhamnose proche de celles trouvées avec le polyoside "brut". C'est

donc cette dernière purification qui permet d'obtenir des polyosides purifiés identiques contenant 20 % de rhamnose.

o

o

o

Les résultats de cette étude, résumé dans le Tableau XI (cf. p. 47) semblent montrer qu'à côté du polyoside à 20 % de rhamnose, il existe, dans les bacilles cultivés sur gélose nutritive pendant 18 heures à 37° (utilisés pour toute cette étude), une substance inconnue, riche en rhamnose (ou en un autre corps donnant un spectre d'absorption voisin au dosage de DISCHE et SHETTLES), plus facilement extractible par la solution physiologique, non précipitable par l'acide acétique glacial et non dialysable.

CHAPITRE III

ETUDE DES CONDITIONS PERMETTANT D'OBTENIR

LE POLYOSIDE "BRUT" A 20 % DE RHAMNOSE

Les conditions du chapitre précédent excluent la possibilité d'obtenir des extraits contenant un polyoside à 20 % de rhamnose à partir des bacilles cultivés 18 heures à 37° sur la gélose nutritive. En effet, il ne peut être question de laver les bacilles par la solution physiologique, puisque ce lavage fait perdre de l'antigène O [38] et fausse le dosage.

Nous avons alors pensé que cette substance, si facilement extractible par simple lavage, pouvait être extraite de bacilles dépourvus d'antigène O éventuellement formés par mutation au cours de la croissance. Or, on sait le rôle joué par le temps de culture et la composition du milieu sur la structure antigénique des bacilles [9]. Nous avons donc étudié successivement ces deux facteurs dans l'espoir d'obtenir des bacilles uniformément recouverts d'antigène O et, par conséquent, des extraits dépourvus de la substance perturbatrice.

INFLUENCE DU TEMPS DE CULTURE

LEVADITI et AUGIER [22] ont montré qu'après 10 heures la moitié des bacilles, cultivés en bouillon, présentaient des caractères de sénescence ; STAUB et COMBES [34] ont constaté que les bacilles jeunes (recueillis après 4 et 8 heures de culture en bouillon ou sur gélose) ne perdaient pas d'antigène O au cours des lavages par la solution physiologique comme les bacilles de 18 heures.

Il était donc logique d'espérer qu'en arrêtant la culture après un temps convenable, on pourrait obtenir des extraits aussi riches en polyside que ceux des bacilles de 18 heures, mais ne contenant pas la substance perturbatrice. Nous avons travaillé successivement sur des bacilles cultivés sur gélose nutritive ou en bouillon.

Culture sur gélose nutritive

Les souches T. 1300 W V et T.1490 W V, entraînées par les trois passages habituels, ont été ensemencées sur 6 boîtes de ROUX.

2 boîtes ont été laissées 6 heures à 37°, 2 autres 8 h. et les dernières, 18 heures. Les bacilles, récoltés et traités selon la technique ordinaire, ont donné 6 extraits contenant le polyside "brut" dont nous avons déterminé la teneur en rhamnose.

Les résultats, consignés dans le Tableau XII A, cf. p.55, montrent que, quel que soit le temps de culture, le pourcentage de rhamnose dans le polyside est toujours supérieur à 20 %.

Culture en bouillon

Les bacilles cultivés sur gélose nutritive ne sont pas forcément tous au même stade de croissance et, de toute façon, il est impossible d'en établir une courbe de croissance. C'est pour obvier à ces deux inconvénients que nous les avons cultivés en milieu liquide. Nous avons utilisé le bouillon qui sert à préparer les géloses nutritives.

Afin de déterminer le temps nécessaire et suffisant pour que tous les bacilles soient en phase logarithmique, nous avons, tout d'abord, établi la courbe de croissance de quelques souches dans des conditions strictes d'ensemencement, d'agitation et de température.

A partir d'une culture des différentes souches de S.typhi sur gélose nutritive, (entraînées suivant les indications données dans le chapitre I et dont nous avons contrôlé l'aspect lisse "SMOOTH")

TABLEAU XII

TENEUR EN RHAMNOSE DE DIVERSES SOUCHES DE S. TYPHI
CULTIVEES SUR DES MILIEUX DIFFERENTS PENDANT DES TEMPS VARIABLES

Expériences	Souche	Temps de culture	Milieu	% de Rhamnose
A	1300	6 heures 8 heures 18 heures	gélose	25 25 27
	1490	6 heures 8 heures 18 heures	gélose	23 24 27
B	1300	4 h. 30 18 heures	bouillon	46 26
	1490	4 h. 30 18 heures	bouillon	- 28
	1566	4 h. 30 18 heures	bouillon	- 24
C	1490	4 h. 30 18 heures	extrait levure liquide	20 18,5
	1300	18 heures	extrait levure liquide	18,5
	1566	18 heures	extrait levure liquide	19
D	1300 1490 1566	18 heures	extrait levure solide	19 20 19

nous ensemençons un tube de bouillon. Après 24 heures à 37°, nous ensemençons avec deux gouttes de cette culture un erlenmeyer contenant 100 cm³ de bouillon. Au bout de 12 heures, cette semence est encore en phase logarithmique et nous mettons 50 cm³ de cette culture dans un récipient de FERNBACH contenant 500 cm³ de bouillon ; celui-ci est placé à 37° dans un agitateur. Nous prélevons, toutes les heures, un cm³ de culture pour dénombrer les bacilles à l'aide du photomètre de Meunier. Nous traçons une courbe de croissance en coordonnées semi-logarithmiques en portant en abscisse le temps de culture et en ordonnée le log. 2 de la densité optique lue au photomètre (fig.5).

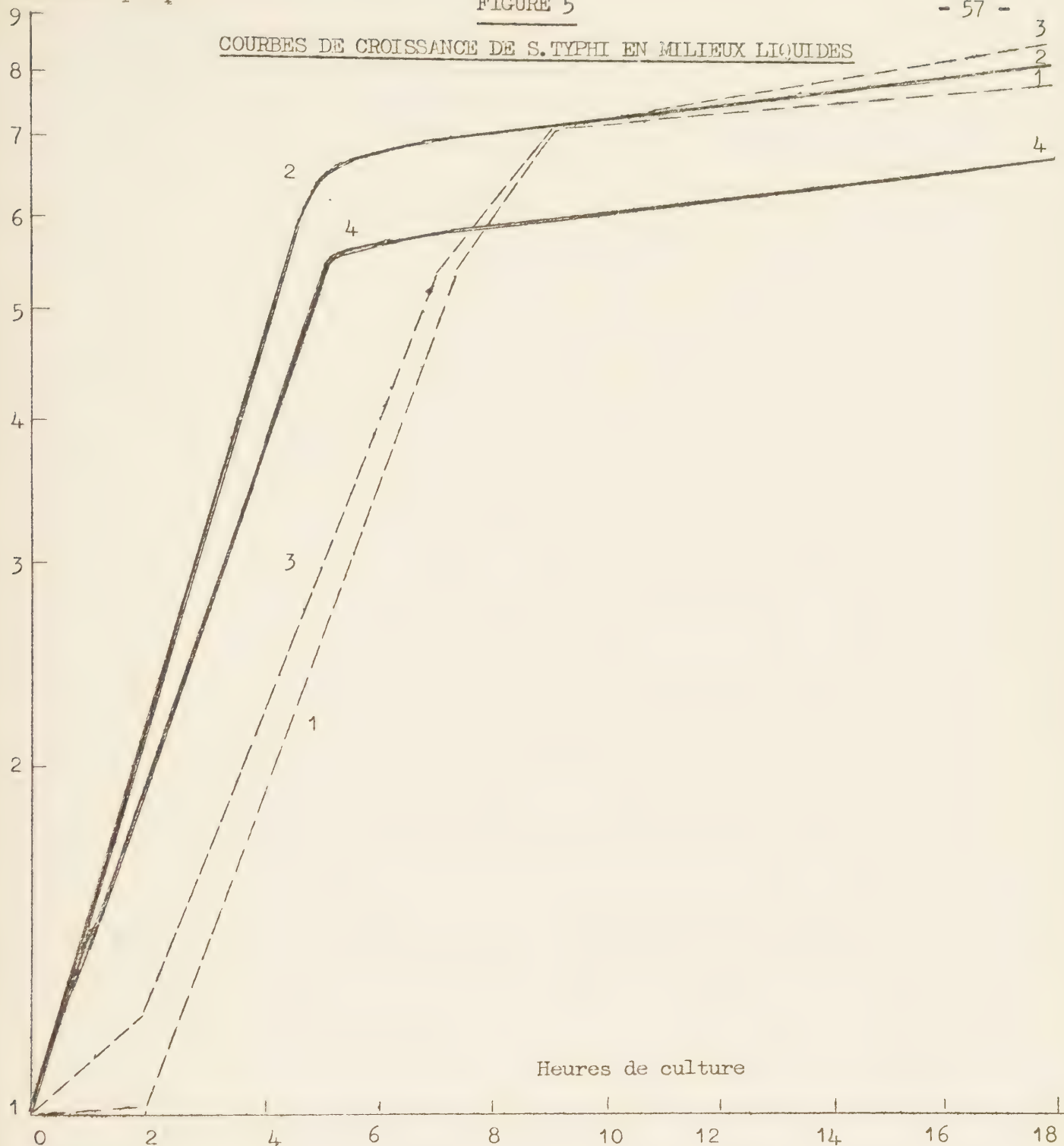
Les courbes obtenues montrent que les bacilles sont en phase de croissance logarithmique à 4 h.30 de culture.

Après avoir préparé, suivant la technique habituelle, le polyoside "brut" des bacilles de la souche 1300 recueillis après 4 h.30 de culture, nous avons déterminé sa teneur en rhamnose : elle est très supérieure à 20 % (Tableau XII, B cf. p. 55).

INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE

La gélose nutritive et le bouillon qui sert à la préparer sont des milieux dont nous ignorons la composition qui varie, d'ailleurs, d'une préparation à l'autre. STAUB, COMBES et LE MINOR [34] ont insisté sur le rôle que jouent ces variations de milieu de culture, sur la quantité d'antigène O présent dans les bacilles. Il était donc souhaitable d'utiliser un milieu de composition connue afin de pouvoir en faire varier les constituants. Nous avons, tout d'abord, pensé au milieu synthétique recommandé par MAALOE [24].

Malheureusement, les souches, entretenues au laboratoire et utilisées pour cette étude, ne poussent pas toutes dans ce milieu ; il a dû apparaître, au cours des repiquages de certaines souches, des mutants incapables de se développer à partir de la cystine et du tryptophane, seuls acides aminés présents dans ce milieu.

COURBES DE CROISSANCE DE S. TYPHI EN MILIEUX LIQUIDES

(1) - Courbe de la souche 1300 en milieu extrait de levure

(2) - Courbe de la souche 1300 en bouillon

(3) - Courbe de la souche 1490 en milieu extrait de levure

(4) - Courbe de la souche 1490 en bouillon.-

Si par contre, on remplace les deux acides aminés par un extrait de levure (Byla ou Pasteur) toutes les souches, que nous avons eues en mains, sont capables de s'y développer.

FORMULE DU MILIEU A L'EXTRAIT DE LEVURE :

sulfate de magnésium	0,1 gramme
sulfate d'ammonium	4
citrate trisodique	14
glycérol	30 cm ³
tampon phosphate M/15 (°)	100 "
eau distillée q. s. p.	1.000 "
extrait de levure Pasteur (+)	40 ‰

Le mélange est préparé juste avant la stérilisation à 120°.

Milieu liquide

Nous avons suivi la croissance des souches T.1490 et T.1300 dans ce milieu en opérant comme précédemment dans le bouillon, les souches ayant été entraînées non plus en bouillon et sur gélose nutritive, mais avec ce milieu.

Les courbes obtenues (fig.5 cf. p. 57) montrent que les bacilles sont en phase de croissance logarithmique après 4 h.30 de culture, comme dans le bouillon.

Après avoir préparé les polyosides "bruts" avec ces bacilles, suivant la technique habituelle, nous avons déterminé leur teneur en rhamnose.

(°) Formule du tampon :

Solution M/15 phosphate disodique 12 OH ₂	23 gr ‰
" " monopotassique	9 " ‰
mélanger 80,8 cm ³ de solution de phosphate disodique et	
19,2 cm ³ de solution de phosphate monopotassique,	
ce qui donne un PH = 7,4.	

(+) L'extrait de levure Pasteur contient les acides aminés suivants : alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, leucine, lysine, sérine, phénylalanine, thréonine, tyrosine et valine.

Les résultats consignés dans le tableau XII, C (cf. p. 55) montrent que, pour la première fois, on obtient un polyoside "brut" contenant 20 % de rhamnose après 4 h. 30 (phase logarithmique) comme après 18 heures de culture.

Milieu solide

Pour des raisons de commodité dans l'usage courant du dosage, nous avons recherché si le milieu à l'extrait de levure gélosé à 30 ‰ permettait d'obtenir des bacilles dont les extraits contenaient un polyoside à 20 % de rhamnose. Ces essais effectués avec les souches T.1490, 1300 et 1566 cultivées 18 h. sur ce milieu solide ont montré que l'on retrouvait bien les 20 % obtenus avec les mêmes souches cultivées en milieu liquide (Tableau XII, D cf. p. 55).



Une des explications possible serait qu'il se fait en bouillon et sur gélose une mutation qui donne des germes avec un polyoside différent et en moindre quantité, séparé par la purification par l'acide acétique dans la préparation des polyosides purifiés.

Par contre, sur milieu à l'extrait de levure qu'il soit liquide ou solide, on retrouve le même polyoside que dans les premières préparations purifiées et, ceci, indépendamment de l'âge des germes.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Le polyoside "brut" présent dans les extraits contient bien 20 % de rhamnose à condition que la culture soit effectuée en milieu à l'extrait de levure.

TROISIEME PARTIE

MISE AU POINT ET PREMIERE APPLICATION
D'UNE TECHNIQUE DE "ROUTINE"

Le but que nous nous étions proposée au début de ce travail était d'établir une méthode de routine susceptible de remplacer la technique trop longue de STAUB et COMBES.

La possibilité de titrer le polyoside dans les extraits, tels que les préparaient ces auteurs, par le rhamnose qu'il contient, simplifiait la technique ; elle rendait inutile l'emploi de sérum et supprimait le dosage immuno-chimique plus long que celui du rhamnose. Cela ne suffisait pourtant pas pour doser rapidement un grand nombre de souches. Il fallait appliquer le principe de la technique à des extraits obtenus à partir de petites quantités de bacilles.

Une très grande simplification aurait été apportée, s'il avait été possible de doser directement le rhamnose dans ces bacilles. C'est ce que nous avons tenté de faire : le Chapitre I montrera que ce fut un échec.

Nous avons alors établi sur la souche T.1490 les détails d'une technique qui permet de doser le polyoside O de huit souches en l'espace de quatre jours. Les détails en seront donnés dans le Chapitre II.

Afin de nous assurer de la validité de la méthode pour toutes les souches, nous l'avons appliquée à sept autres souches plus ou moins récemment isolées, en dosant en même temps le polyoside par la technique immuno-chimique, comme base de référence. Quatre de ces souches ayant fourni encore une fois un extrait trop riche en rhamnose (apparent), nous avons cherché à modifier la technique pour pouvoir l'appliquer à ces souches. Ceci fera l'objet du Chapitre III.

Devant l'insuccès de nos efforts, nous avons du remplacer le dosage de rhamnose final par le dosage immuno-chimique initialement proposé par STAUB et COMBES. Ceci allonge un peu le temps de la technique, mais la laisse encore très utilisable pour un dosage de routine. C'est ce qu'illustre l'exemple d'application donné à la fin de ce dernier chapitre.

TABLEAU XIII

TENEUR EN RHAMNOSE DES GERMES ET DES EXTRAITS CORRESPONDANTS

Scroches ayant fourni l'extrait	µg de rhamnose dans la suspension de bacilles	µg de rhamnose dans l'extrait	µg de différence
T.50.II ou 556W	165	135	30
T.1300 W V	180	158	22
T.1470 W V	145	125	20
T.J 07	110	85	25

CHAPITRE I

ESSAI DE DOSAGE DIRECT DU RHAMNOSE DANS LES BACILLES

Les 4 souches T.556 W, T. 1300 W V, T.1470 W V, T.J07 entraînées par les trois passages habituels, ont étéensemencées sur deux boites de ROUX. Après 18 heures de culture à 37°, les bacilles récoltés dans 50 cm³ de solution physiologique, ont été précipités par l'alcool selon le protocole ordinaire.

Avant d'hydrolyser les bacilles, nous avons dosé le rhamnose sur une partie de la suspension. Le reste nous a servi à préparer le polyoside "brut" selon la technique de STAUB et COMBES et nous avons dosé le rhamnose de cet extrait.

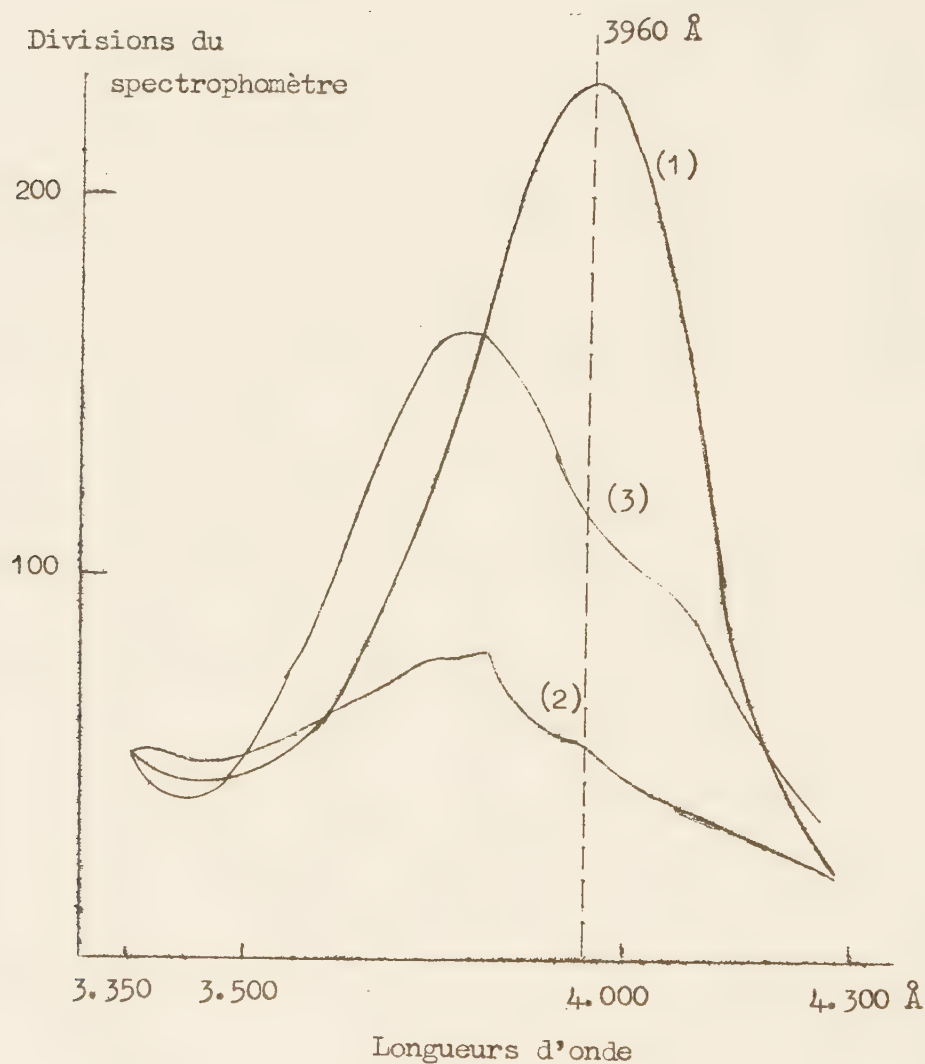
Les résultats du Tableau XIII nous montrent qu'il y a moins de rhamnose dans l'extrait que dans les bacilles.

Pour chercher la cause de cette différence, nous avons dosé le rhamnose dans les bacilles ayant subi une, deux, trois et quatre hydrolyses acétiques : la réaction de DISCHE et SHETTLES a toujours été positive. Nous nous sommes alors demandés s'il s'agissait vraiment de rhamnose ou, au contraire, d'une autre substance susceptible de donner une couleur proche de celle du rhamnose en présence d'acide sulfurique et cystéine. La figure 6 (cf. p.66) montre que les courbes d'absorption de la couleur fournie par le rhamnose (courbe I) et par les germes hydrolysés (courbe 2) sont tout-à-fait différentes, ce qui prouve que :

- 1) la substance présente dans les bacilles hydrolysés dosée par la technique de DISCHE et SHETTLES n'est pas du rhamnose.
- 2) qu'après deux hydrolyses par l'acide acétique N/5 l'extraction du polyoside des bacilles est totale comme la méthode immunochimique l'avait déjà montré à STAUB et COMBES.

FIGURE 6

COURBES D'ABSORPTION DE LA "COULEUR" OBTENUE, AVEC LE RHAMNOSE,
LES GERMES HYDROLYSES DEUX FOIS ET LES GERMES "R",
PAR LA TECHNIQUE DE DISCHE et SHETTLES



- I : Courbe de référence faite avec 10 μ g de rhamnose,
2 : courbe obtenue avec les germes hydrolysés,
3 : courbe obtenue avec les germes "R".

La "substance", présente dans les germes hydrolysés, se retrouve aussi dans les germes R (courbe 3) qui ne possèdent pas de rhamnose : les courbes d'absorption sont identiques. Le maximum d'absorption qu'elles présentent à $3.800 \text{ \AA}$ est très proche des $3.750 \text{ \AA}$ donnés par DISCHE [5] pour les 2-désoxy-pentoses et il est fort possible que l'acide désoxyribonucléique des noyaux soit responsable de cette réaction.

Quoiqu'il en soit un simple examen de la Figure 5 montre quelle perturbation la présence de cette "substance" peut apporter au dosage du rhamnose, pour lequel on utilise la différence d'absorption entre 3960 et $4300 \text{ \AA}$. Cette différence, pour les germes hydrolysés, correspondrait à celle donnée par 20 à $30 \text{ } \mu\text{g}$ de rhamnose dans la quantité de bacilles utilisés pour les colonnes du Tableau XIII, cf. p.64. Cette valeur correspond bien aux écarts observés (4ème colonne du Tableau XIII) entre le rhamnose dosé dans les bacilles et celui dosé dans l'extrait.

o

o o

Un dosage direct du rhamnose dans les bacilles ne peut donc pas être utilisé pour doser l'antigène O qu'ils contiennent.

CHAPITRE II

REDUCTION DES TEMPS OPERATOIRES ET MISE AU POINT

SUR LA SOUCHE T.1490 D'UNE TECHNIQUE PRATIQUE

Nous avons donc abandonné le dosage du rhamnose effectué directement sur les bacilles et cherché à rendre plus pratique et plus utilisable pour la routine la préparation des extraits nécessaire avant tout dosage.

Nous avons essayé, tout d'abord, de supprimer certains temps de la préparation des extraits, puis d'opérer sur de plus petites quantités.

Nous donnerons finalement la technique exacte à laquelle cette étude nous a conduits.

REDUCTION DES TEMPS OPERATOIRES

En se rapportant au schéma II (cf. p.38), on voit que la préparation de l'extrait comporte essentiellement trois temps : le lavage des bacilles par 2 précipitations alcooliques, les hydrolyses et les purifications de l'hydrolysats.

Quelques essais nous ont montré que des extraits "à blanc" (obtenus à partir de gélose nutritive stérile) contenaient toujours une "substance" susceptible de perturber les dosages de rhamnose. Il ne pouvait donc pas être question de supprimer le premier temps : le lavage des bacilles au moyen de deux précipitations alcooliques.

TABLEAU XIV

ESSAIS DE REDUCTION DES DIFFERENTS TEMPS DU DOSAGE

	Neutralisation	Précipitations alcooliques		Rhamnose dosé
		1ère	2ème	
<u>Expérience A</u>				
souche T.35.52				
I	+	-	-	30
2	-	+	+	32
témoin	+	+	+	24
<u>Expérience B</u>				
souche 1470				
I	+	+	-	35
témoin	+	+	+	33

Par contre, STAUB et COMBES avaient indiqué [33] que la quantité de polysaccharide restant dans les bacilles après la première hydrolyse était, au plus, égale à 2 % de celle extraite la première fois. Il nous a donc semblé possible de supprimer cette seconde hydrolyse.

Nos efforts se sont surtout concentrés sur les différents temps de la purification : neutralisation des hydrolysats, précipitation alcoolique et dessiccation.

Il ne pouvait être question de supprimer le dernier temps qui élimine l'alcool utilisé pour la précipitation.

Il restait donc à essayer la neutralisation suivie d'aucune précipitation alcoolique ou d'une seule précipitation et les précipitations sans neutralisation préalable.

Nous avons effectué dans ce sens les expériences portées sur le Tableau XIV ; la teneur en rhamnose de l'extrait comportant la totalité des opérations,

a été prise comme référence et tout extrait donnant un résultat supérieur à celui-ci, considéré comme insuffisamment purifié. On voit que c'est le cas pour l'extrait non neutralisé avant les précipitations alcooliques (exp. A₂ du Tableau XIV), et celui non précipité par l'alcool après la neutralisation (exp. A₁, Tableau XIV), l'écart des chiffres trouvés 30 et 32, avec les 24 trouvés pour l'extrait témoin, dépassant surement les erreurs expérimentales possibles.

Par contre, la deuxième précipitation alcoolique ne semble pas nécessaire, puisque l'écart entre les chiffres 35 et 33 trouvés pour l'extrait B₁ et l'extrait témoin B reste dans l'ordre des erreurs expérimentales (34 ± 1).

Les différents temps de la préparation des extraits demeurent donc :

- 2 précipitations alcooliques des bacilles par 2 volumes d'alcool,
- 1 hydrolyse par l'acide acétique N/5,
- neutralisation de l'hydrolysate et centrifugation,
- précipitation du "surnageant" par 9 volumes d'alcool,
- lavage par l'alcool et dessiccation du précipité.

REDUCTION DU MATERIEL UTILISE

Le volume (30 cm³) utilisé par STAUB et COMBES nécessitait un matériel compliqué (centrifugeuse de 4 pots de 1 litre et ballons avec réfrigérant ascendant). L'expérience avait montré à ces auteurs qu'il était impossible, dans ces conditions, de doser plus de 4 souches à la fois. Il s'agissait donc, pour nous, de réduire les volumes sans nuire à la précision de la technique.

Il est, en effet, peu important de perdre 0,1 cm³ de "surnageant" au cours de la décantation des divers précipités lorsqu'on travaille sur 30 cm³ ; cela devient impossible lorsqu'il s'agit de 2 cm³. Pour éviter ces pertes inévitables, nous avons tout d'abord pensé effectuer l'hydrolyse directement dans des pots à centrifuger de 30 cm³ munis d'un bouchon rodé. Les résultats portés dans le tableau XV (A) montrent qu'il nous a été impossible d'obtenir, de cette façon, des polysides "bruts" contenant 20 % de rhamnose. Nous avons constaté d'ailleurs que la neutralisation des hydrolysats obtenus ainsi,

TABLEAU XV

ESSAIS DE REDUCTION DES VOLUMES UTILISES

Expériences	souches	Matériel utilisé	% rhamnose dans le polyside
A	1562	Pots à centrifuger fermés avec un bouchon rodé	14
	1035	Hydrolyse deux heures	32
B	1490	Ampoules scellées Hydrolyse 2 heures	24
C	1490	Ampoules scellées Hydrolyse :	
		3 heures	22,5
		2 heures	22,5
		1 h. 30	21
		1 heure	20,5
		30 minutes	20
		Ballon Hydrolyse 2 heures	20

demandait des quantités de soude très variables d'un tube à l'autre. Il est donc certain que, malgré les précautions prises, il y avait des fuites et les conditions d'hydrolyse n'étaient plus celles sur lesquelles était basé notre dosage (acide acétique N/5). Il nous fallait donc renoncer à ce mode opératoire. Afin de rester dans des conditions d'hydrolyse constantes, nous avons alors décidé d'opérer dans des ampoules scellées. Pour éviter toute perte au cours des transvasements, il fut décidé de remplacer les décantations, après hydrolyse et neutralisation, par des pipetages précis de quantités aliquotes et de neutraliser l'extrait en présence d'un indicateur coloré (solution mixte de MA et ZUAZAGA cf. p. 21) dans une fiole jaugée qui réaliserait une

première dilution. Le dosage de DISCHE et SHETTLES permet, en effet, de doser des quantités de rhamnose beaucoup plus faibles que celles d'azote dosées par MICROKJELDAHL, auxquelles nous rapportons comme STAUB et COMBES le polyoside dosé (cf. p. 7). Ceci permet de diluer jusqu'à 25 fois l'extrait primitif. Nous avons donc recherché le pourcentage de rhamnose du polyoside brut présent dans un extrait de la souche 1490, préparé en suivant exactement les détails de la technique décrite plus loin (p. 74).

Nous avons encore trouvé 24 % de rhamnose (Tableau XV, expérience B, cf. p. 72). Cet échec ne pouvait venir d'une concentration ou d'une perte d'acide par évaporation. Toutefois, il était possible qu'en ampoules scellées la libération du polyoside spécifique se fasse beaucoup plus rapidement qu'en ballon ouvert. L'augmentation relative du rhamnose pouvait alors s'expliquer par deux hypothèses :

1) le polyoside rapidement libéré se dégradait, il perdait ses propriétés précipitantes vis à vis du sérum tout en conservant son rhamnose.

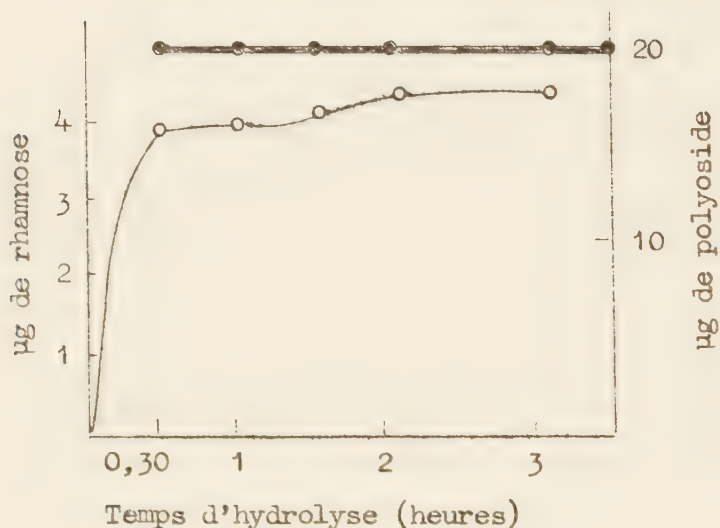
2) le polyoside ne se dégradait pas, mais les bacilles, ayant perdu leur antigène O, libéraient lentement dans l'extrait la "substance" perturbatrice du dosage de rhamnose.

Nous avons donc hydrolysé, pendant des temps variables, la même suspension de bacilles (T.1490) répartis dans quatre ampoules scellées différentes ainsi que, en plus grosse quantité, dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant. Les résultats portés sur le Tableau XV (expérience C cf. p. 72) montrent que si l'on ne retrouve pas les 24 % de l'expérience précédente (exp. B), effectuée partout avec la même souche, on trouve encore 22,5 % après 2 et 3 heures d'hydrolyse alors qu'après 30 minutes on retrouve les 20 %, obtenus également dans l'extrait préparé dans le ballon après 2 heures d'hydrolyse. La figure 7 montre, en outre, que dès 30 minutes, la totalité du polyoside est extraite et qu'il ne se dégrade pas après 2h.30 d'hydrolyse supplémentaire ; par contre, la quantité de "rhamnose" dosée par la méthode de DISCHE et SHETTLES augmente faiblement entre 30 minutes et deux heures d'hydrolyse.

Il faut donc nous rallier à la deuxième explication proposée plus haut : libération dans l'extrait de la "substance" perturbatrice du dosage. Puisque la totalité du polyoside est libérée après 30 minutes d'hydrolyse, il faut arrêter celle-ci après ce temps.

FIGURE 7

DOSAGES DU POLYOSIDE ET DU RHAMNOSE APRES DIFFERENTS TEMPS D'HYDROLYSE



TECHNIQUE EXACTE DU DOSAGE

Préparation de la suspension microbienne

Les souches sont entraînées par les trois passages habituels dans le milieu décrit p.58 puis ensemencées sur trois tubes (°) du même milieu solidifié. Après 18 h. à 30°, on récolte chaque tube dans 2 cm³ de solution physiologique. Après avoir vérifié que la suspension microbienne contenait entre 50 et 80 milliards de bacilles par

(°) Il s'agit de tubes dits de 22 (diamètre : 2,2 cms, hauteur : 22 cms) contenant 20 cm³ environ du milieu solidifié en couche inclinée.

cm³, on le précipite par deux volumes d'alcool. Après quelques heures à la température du laboratoire et centrifugation, le précipité est repris par 6 cm³ de solution physiologique et précipité une deuxième fois.

Dosage d'azote et hydrolyse

Ce second précipité est mis en suspension dans 6 cm³ d'eau distillée. On prélève deux fois 0,5 cm³ qui serviront pour les dosages d'azote par Microkjeldahl (p. 21). On ajoute 1 cm³ d'acide acétique normal à 4 cm³ de la suspension pour effectuer l'hydrolyse en ampoules scellées. Après une demi-heure au bain-marie bouillant, on centrifuge le contenu de l'ampoule.

Préparation de l'extrait et dosage du rhamnose

On neutralise par la soude normale 2,5 cm³ exactement mesurés du "surnageant" (correspondant à 2 cm³ de la suspension de départ) dans des fioles jaugées de 5 cm³ en présence de 2 gouttes du réactif de MA et ZUAZAGA (formule donnée p.21). On complète à 5 cm³ par de l'eau bi-distillée, on agite et on centrifuge pour éliminer le précipité qui se forme. Durant ces manipulations l'hydrolysate a été dilué 2,5 fois.

On prélève à nouveau 2 cm³ de "surnageant" et on les précipite par 9 volumes d'alcool.

Après 15 heures à la température du laboratoire, le précipité est lavé deux fois par l'alcool en ayant soin de prélever le "surnageant" avec une pipette pour ne pas perdre de précipité et desséché sous vide sur P₂O₅.

Il est repris dans 10 cm³ d'eau bi-distillée ce qui amène l'extrait à une dilution finale au 1/12,5.

On dose le rhamnose par la méthode de DISCHE et SHETTLES sur 0,5 et 1 cm³ de l'extrait final.

Calcul de la valeur P/N

La valeur trouvée (R) est convertie en polyoside en multipliant par 5 et rapportée à la suspension de départ en multipliant par 12,5.

On peut ainsi obtenir le rapport $\frac{\text{Polyoside des bacilles}}{\text{azote}}$

$$\frac{P}{N} = \frac{5 \times 12,5 \times R}{N}$$

°

°

°

Il est possible de réduire les temps opératoires et les quantités données par STAUB et COMBES et d'établir une technique de routine dont nous avons établi les détails avec la souche T.1490.

CHAPITRE III

ESSAI DE GENERALISATION DE LA TECHNIQUE

ET RETOUR AU DOSAGE FINAL PAR IMMUNOCHIMIE

Nous avons appliqué à sept autres souches la technique mise au point avec la souche 1490 dans le chapitre précédent.

Les résultats de cette étude nous ont amenée à rechercher quelles modifications nous pouvions apporter à cette technique pour essayer de conserver le dosage de rhamnose final.

APPLICATIONS AUX SEPT SOUCHES

Sept souches, plus ou moins récemment isolées, ont été traitées selon la technique décrite p. 74 et le polyoside présent dans les extraits a été en outre dosé par l'immunologie (cf. p. 42).

L'expérience montre (Tableau XVI) que si les trois souches 92, 1490, 5979 ont toujours fourni des polyosides "bruts" contenant près de 20 % de rhamnose, les résultats obtenus avec les cinq autres souches sont variables d'un dosage à l'autre et d'une souche à l'autre.

TABLEAU XVI

% APPARENT DE RHAMNOSE DU POLYOSIDE CONTENU
DANS LES DIVERS EXTRAITS(+)

Souche N°	Dosage I	Dosage II
92	21	20
1300	18,3	20
1490	20	20
1562	18,2	25
5979	19	19
5980	24	22
5981	22	17
5982	23	22

(+) Calculé suivant les procédés habituels.

ESSAIS DE MODIFICATION DU TEMPS D'HYDROLYSE

Il semble donc que la substance perturbatrice qui, dans le cas de la souche 1490 n'était pas extraite après trente minutes d'hydrolyse, puisse apparaître plus tôt avec d'autres souches ; nous avons alors essayé de réduire le temps d'hydrolyse de la souche 1562 qui avait fourni un polyoside "brut" particulièrement riche en rhamnose.

Des dosages effectués sur des extraits obtenus avec des temps d'hydrolyse plus courts, montrèrent (Tableau XVII) que trente minutes étaient nécessaires pour extraire la totalité du polyoside et que de plus, le polyoside extrait avant ce temps contenait toujours apparemment plus de 20 % de rhamnose.

TABLEAU XVII

MODIFICATION DU TEMPS D'HYDROLYSE DE LA SOUCHE 1562

	μg de rhamnose dans 1 cm^3 d'extrait		μg de polyoside dans 1 cm^3 d'extrait	% de rhamnose dans le polyoside	
	lecture après 2 h.	lecture après 24 h.		après 2 h.	après 24 h.
10 min.	4,7	5,6	18,5	25	30
20 min.	5,4	5,7	22,4	24	25
30 min.	5,8	6,3	26,4	22	24
1 heure	6,3	6,6	26,4	24	25

ESSAIS DE MODIFICATION DE LA TECHNIQUE DE DISCHE ET SHETTLES

N'ayant pu extraire le polyoside sans la substance perturbatrice, nous avons cherché à identifier celle-ci.

DISCHE signale [5] trois causes d'erreur dans le dosage qu'il préconise avec SHETTLES :

1) les heptoses, présents dans les Salmonella, sont susceptibles de perturber le dosage du rhamnose si on lit les résultats après deux heures, mais ne peuvent être mis en cause dans les lectures faites après vingt-quatre heures.

2) les désoxyriboses, au contraire, ne modifient pas la lecture faite après deux heures, mais perturbent celle faite après vingt-quatre heures.

3) les stérols peuvent gêner le dosage, mais il est facile d'éliminer l'erreur due à leur présence en soustrayant l'absorption obtenue avec un mélange d'acide sulfurique et d'extrait sans ajouter de cystéine.

Nous avons donc lu nos dosages de rhamnose après deux et vingt-quatre heures et nous y avons inclus des tubes ne contenant que l'acide sulfurique et l'extrait, sans cystéine.

Les résultats donnés dans le Tableau XVII nous montrent que quel que soit le temps de la réaction, le pourcentage de rhamnose est toujours supérieur à 20 %.

La substance perturbatrice n'est donc ni un heptose ni l'acide désoxyribonucléique, ou alors nos extraits contiennent ces deux sucres. Pour les stérols, les essais faits sur différentes souches ont montré que l'absorption en présence d'acide sulfurique seul était nulle : ils ne sont donc pas en cause.

Afin de nous rendre compte si cette substance présente dans nos extraits, donnait un produit dont la couleur s'ajoutait à celle du rhamnose ou modifiait la réaction propre de ce sucre, nous avons ajouté un étalon interne de rhamnose à nos extraits, comme l'avaient suggéré DISCHE et SHETTLES [7].

Le tableau XVIII montre que les résultats semblent différents suivant les souches, bien que les deux extraits aient donné un pourcentage de rhamnose trop fort, le rhamnose interne de l'extrait I a donné le même chiffre que l'étalon de rhamnose en eau bidistillée. On ne peut donc utiliser cet artifice pour connaître la quantité de rhamnose présente dans nos extraits.

TABLEAU XVIII

ADDITION AUX EXTRAITS D'UNE QUANTITE CONNUE DE RHAMNOSE

	$\Delta (E_{3960} - E_{4300})$	Δ du aux 10 μ g de rhamnose
Rhamnose 10 μ g	165	165
Extrait I + eau bid.	70	-
Extrait I + 10 μ g de rhamnose	235	165
Extrait II + eau bid.	58	-
Extrait II + 10 g de rhamnose	236	178

ESSAIS DE DESTRUCTION DE LA SUBSTANCE PERTURBATRICE

La seule solution possible était donc d'essayer de détruire ou d'éliminer la substance perturbatrice. Nous avons successivement essayé l'éther dans le cas où il s'agirait de lipides, l'acide acétique glacial dont nous connaissons l'action sur les polyosides purifiés (cf. p. 50) et les hydrolyses prolongées par un acide minéral fort.

a) Après les deux précipitations alcooliques par deux volumes d'alcool (cf. Technique p. 74) nous avons extrait le précipité par l'éther, puis, nous l'avons hydrolysé 30 minutes par l'acide acétique N/5 suivant le protocole habituel : le pourcentage de rhamnose était toujours différent de 20 %.

b) Comme nous l'avons vu dans la préparation du polyoside pur, la précipitation par l'acide acétique glacial joue un rôle important dans sa purification. Nous avons donc précipité, après la dernière purification alcoolique, les extraits des souches 5980 et 5982 par de l'acide acétique glacial à 94 % : cela n'a rien changé à la quantité de rhamnose "apparent", toujours supérieur à 20 %.

c) L'extrait de la souche 1562 préparé suivant le protocole habituel a été hydrolysé durant 1 heure, 2 heures, 4 heures et 8 heures par de l'acide sulfurique N : la substance gênante n'a pas été détruite.

TECHNIQUE DU DOSAGE DE ROUTINE IMMUNOCHIMIQUE ET RESULTATS

Devant l'inefficacité de tous ces essais, nous avons dû revenir au dosage immunochimique préconisé par STAUB et COMBES.

La technique est identique à celle décrite p.74 mais, après dessiccation, on reprend l'extrait dans 20 cm³ de solution physiologique merthiolatée ce qui porte la dilution à 25 par rapport à l'azote ou, si l'on suppose les souches pauvres en antigène O, dans 10 cm³. Le dosage du polyoside est effectué par immunologie selon la technique décrite p.42 en précipitant un sérum préalablement étalonné avec un polyoside purifié. Nous utilisons un sérum contenant 120 µg d'azote d'anticorps précipitables dans 0,5 cm³. Dans ces conditions, nous ajoutons à 0,5 cm³ de sérum : 0,5 , 0,75 , 1 et 1,5 cm³ ou 0,25 , 0,5 , 0,75 et 1 cm³ d'extrait, suivant sa concentration en polyoside, en sorte que les quatre points se trouvent sur la partie ascendante de la courbe. Pour déterminer les quantités d'extraits convenables, on commence par le tube contenant 0,75 cm³ et on compare à l'oeil nu le précipité qui se forme à celui qui apparaît avec 15 µg de polyoside (point situé aux 3/4 de la courbe ascendante).

Comme pour le dosage du rhamnose, le poids de polyoside est rapporté au poids d'azote contenu dans la même quantité de bacilles.

Le Tableau XIX montre que, pour deux dosages effectués à huit jours d'intervalle avec le même extrait de levure, les résultats sont peu différents et que les 8 souches dosées contiennent des quantités de polyoside voisines, donnant une valeur de P/N égale à $0,505 \pm 0,035$, ce qui correspond à environ 6 % de polyoside dans les bacilles secs, si l'on se base sur la valeur moyenne de 12 % trouvée pour l'azote par COMBES [4].

Application du dosage à l'étude des variations de l'antigène O en fonction de la teneur du milieu en source carbonée (glycérol). Nous avons préparé quatre milieux selon la formule donnée p. 65, mais dont la teneur en glycérol, qui est normalement de 30 cm³/litre était de 0,5 , 2 , 5 et 10 cm³. Nous avons alors ensemencé la souche 5982 (entraînée sur le milieu habituel à 3 % de glycérol) sur ces quatre milieux et préparé les extraits selon le protocole habituel.

Nous avons établi le rapport P/N selon la dernière technique (dosage final par l'immunochimie). Le Tableau XX montre qu'il faut descendre jusqu'à 0,5 de glycérol pour constater une baisse dans la production de l'antigène O.

TABLEAU XIX

RESULTATS DES DOSAGES SUR HUIT SOUCHES DE S. TYPHI

Souches N°	µg d'azote		µg de polyoside		P/N		P/N moyen
	Dosage I	Dosage II	Dosage I	Dosage II	Dosage I	Dosage II	
92	755	820	335	420	0,44	0,50	0,47
1300	796	720	385	360	0,48	0,50	0,49
1490	760	808	355	388	0,46	0,48	0,47
1562	540	844	260	440	0,48	0,52	0,50
5979	808	844	430	450	0,53	0,54	0,53
5980	676	576	326	288	0,48	0,50	0,49
5981	624	880	285	460	0,46	0,52	0,49
5982	608	866	330	480	0,54	0,55	0,54

TABLEAU XX

ROLE DU GLYCEROL DANS LA FORMATION DU POLYOSIDE

Glycérol en %	P/N
0,5	0,28
2	0,63
5	0,65
10	0,60

Il est donc impossible de doser le polyoside des extraits d'après la teneur en rhamnose, comme nous l'indiquions dans le chapitre précédent, un certain nombre de souches libérant au cours de l'hydrolyse une substance qui perturbe le dosage. Néanmoins, la technique immunochimique permet de doser dans ces extraits l'antigène O d'une façon assez rapide. Les résultats des premières applications en ont été donnés.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

Nous nous étions proposée d'établir un dosage rapide de l'antigène O dans les souches de S. Typhi. Nous avions espéré pouvoir utiliser le rhamnose que contient cet antigène comme base de référence.

Le dosage direct sur les bacilles s'est révélé impossible.

Avec quelques souches, nous avons pu établir un mode de préparation d'extraits dans lesquels il était possible de doser le polyside par son rhamnose. Malheureusement, avec d'autres, les mêmes extraits contenaient toujours une substance de nature inconnue qui perturbait le dosage. Cette substance perturbatrice ne pouvait être l'un des autres sucres constitutifs du polyside (glucose, galactose, mannose, tyvelose) puisque le dosage du rhamnose dans le polyside purifié n'offre pas de difficulté. Il ne pouvait donc s'agir que d'une autre substance microbienne présente dans nos extraits insuffisamment purifiés. Une analyse chromatographique après hydrolyse n'indiqua la présence d'aucun autre sucre réducteur ; toutefois on sait combien les heptoses se séparent mal des hexoses en chromatographie et DISCHE [5] a signalé le rôle nocif de ces sucres dans le dosage du rhamnose. De même, le rôle du désoxyribose provenant des désoxyribonucléoprotéines pouvait être mis en cause. Dans ces deux cas, une lecture, soit après 24 heures, soit après deux heures, devait éliminer la cause d'erreur. Or, quel que soit le temps après lequel nous avons lu nos résultats, nous avons toujours obtenu plus de 20 % de rhamnose, alors que avec le polyside purifié ou le rhamnose témoin les lectures ne variaient pas pendant ce laps de temps.

Les résultats obtenus après délipidation par l'éther ou en incluant un tube témoin ne contenant pas de cystéine éliminent aussi la possibilité d'un stérol.

Il faut donc actuellement reconnaître notre ignorance sur la nature de cette substance et renoncer au dosage chimique pour revenir au dosage immuno-chimique proposé par STAUB et COMBES. Toutefois nous avons pu établir des

détails de technique qui conservent sa fidélité et sa précision à la méthode préconisée par ces auteurs, tout en diminuant considérablement le temps qu'elle nécessitait.

Au cours de cette étude, nous avons constaté que des souches apparemment identiques pour les bactériologistes présentent des caractères distinctifs, puisque les mêmes conditions d'hydrolyse libèrent ou non une substance X vraisemblablement située à la surface des bacilles, qui existe dans les diverses souches soit sous forme différente, soit en quantités différentes. Ces dissemblances, inconnues des bactériologistes, peuvent jouer un rôle dans les propriétés vaccinales des bacilles.

Nous avons déjà vu dans la 2ème partie que certaines souches étaient aptes à pousser en présence des seuls tryptophane et cystine alors que d'autres ne le pouvaient pas ; là encore, rien ne semblait les distinguer d'après les critères bactériologiques courants.

Il semble donc nécessaire de posséder d'autres instruments d'investigation pour mieux connaître les différences entre les souches que nous possédons au laboratoire tant que nous ne saurons pas exactement quels antigènes sont en cause dans la vaccination.

RESUME ET CONCLUSIONS

Nous nous sommes proposée de mettre au point une technique de routine rapide et fidèle pour doser l'antigène O dans les bacilles de S.Typhi.

STAUB et COMBES le dosaient déjà d'une manière précise et fidèle mais qui nécessitait trop de temps et de matériel pour être utilisée dans la routine d'un Centre de Salmonella. Leur technique consistait à extraire des bacilles le polyoside O par une hydrolyse acétique ; puis, après une grossière purification (neutralisation, deux précipitations alcooliques, dessiccation) à le doser par précipitation d'un sérum anti S.Typhi préalablement étalonné.

Nous avons donc essayé de remplacer ce dernier dosage par celui du rhamnose présent dans l'antigène O et absent des souches ne possédant pas cet antigène, et d'adapter l'extraction et la purification à des conditions de travail réalisables dans la routine.

1) Le premier point dont il fallait nous assurer était la constance de la proportion du rhamnose dans le polyoside purifié extrait de diverses souches de S.Typhi. Nous avons constaté que ce polyoside, préparé suivant la technique de G.G. FREEMAN, contenait toujours 20 % de rhamnose quelle que soit la composition antigénique (O, H, Vi) de la souche dont il avait été extrait.

2) Le deuxième objectif de notre travail a été de rechercher si le polyoside "brut" présent dans les extraits préparés suivant la technique de STAUB et COMBES contenait toujours, lui aussi, 20 % de rhamnose.

Ce fut un échec : les différents extraits contenaient un polyoside dont la teneur en rhamnose dosée par la technique de DISCHE et SHETTLER variait entre 20 et 27 %.

3) Nous avons alors recherché systématiquement d'où provenait la différence entre les résultats obtenus avec le polyoside pur et celui moins purifié présent dans les extraits. Nous avons constaté que c'était la précipitation du polyoside purifié par l'acide acétique glacial qui permettait d'obtenir un polyoside contenant toujours 20 % de rhamnose.

4) Nous avons supposé que l'impureté, présente dans nos extraits et qui perturbait le dosage du rhamnose, provenait de bacilles en "mauvais état" ne contenant plus intact leur polyoside O. Nous avons alors travaillé avec des germes jeunes en phase de croissance logarithmique. Ce fut sans résultat : la teneur apparente du rhamnose (dosé par la technique de DISCHE et SHETTLER) était toujours supérieure à 20 %.

5) Le "mauvais état" des bacilles pouvait être dû à certaine déficience de notre milieu nutritif. Nous avons donc remplacé le bouillon nutritif, de composition inconnue et variable d'une préparation à l'autre, par un milieu mieux connu. Il nous fut impossible d'en utiliser un purement synthétique auquel certaines souches ne pouvaient s'adapter mais, en remplaçant dans ce milieu les deux acides aminés par un extrait de levure, nous avons obtenu une bonne croissance avec toutes les souches utilisées. Les bacilles d'une culture de 18 h. ou en phase de croissance logarithmique fournissent alors des extraits où le polyoside contient 20 % de rhamnose (les essais ont porté sur quatre souches).

6) Le dosage du rhamnose directement dans les germes est impossible.

7) Pour adapter la technique d'extraction aux besoins de la routine, nous avons été amenée à effectuer les hydrolyses non plus dans des ballons ouverts, munis d'un réfrigérant ascendant, mais dans des ampoules scellées. Nous avons constaté que l'hydrolyse de deux heures devait être réduite à une demi-heure si nous voulions obtenir la totalité du polyoside sans entraîner la libération d'une substance perturbatrice pour le dosage du rhamnose.

8) Les différents temps de la purification ont été étudiés dans l'espoir de pouvoir en supprimer quelques uns : seule, la deuxième précipitation alcoolique a pu être omise.

9) La technique de routine établie sur la souche 1490 comportait donc les temps suivants :

- récolte d'une culture de 18 h. sur gélose inclinée (milieu à l'extrait de levure),
- lavage des bacilles par deux précipitations alcooliques,
- suspension des bacilles dans 6 cm³ d'eau distillée, prélèvement de 0,5 cm³ pour le dosage d'azote par Microkjeldahl (qui sert de référence) et hydrolyse de 4 cm³ par 1 cm³ d'acide acétique normal en ampoules scellées 30 minutes à 100°,
- neutralisation de 2,5 cm³ (contenant 2 cm³ de la suspension primitive) du surnageant en présence du colorant mixte de MA et ZUAZAGA, dilution à 5 cm³, centrifugation (dilution 2,5),
- précipitation de 2 cm³ du surnageant par 18 cm³ d'alcool pur, centrifugation, lavage du précipité par l'alcool et dessiccation sous vide,
- reprise du précipité par 10 cm³ d'eau distillée (dilution $5 \times 2,5 = 12,5$), dosage du rhamnose sur 0,5 et 1 cm³,
- calcul du rapport $\frac{\text{polyoside}}{\text{azote}}$: le poids de polyoside étant obtenu en multipliant la quantité de rhamnose contenu dans 1 cm³ de l'extrait par 5 (rhamnose = 20 % du polyoside) et par 12,5 (dilution de la suspension microbienne sur laquelle est dosé l'azote).

10) Nous avons préparé de cette façon les extraits de sept souches de collection plus ou moins récemment isolées et nous avons dosé le polyoside au moyen du rhamnose et par immunologie : avec trois d'entre elles nous avons retrouvé les 20 % de rhamnose, mais quatre ont donné des valeurs variables.

Malgré tous nos efforts (hydrolyse sulfurique) il nous a été impossible de débarrasser les extraits de ces souches de la substance inconnue qui perturbe nos dosages et de l'identifier.

Il n'est donc pas possible de doser les extraits par le rhamnose et né-

11) L'application de ce dosage au rôle du glycérol dans la formation de l'antigène O montre qu'il faut descendre au-dessous de 2 ‰ de glycérol pour constater une baisse dans la production de cet antigène.

C O N C L U S I O N

A partir de la technique de STAUB et COMBES trop longue pour la routine, nous avons élaboré une méthode utilisable pour ce genre de travail.

Malheureusement, il nous a été impossible de substituer au dosage immuno-chimique celui du rhamnose car certaines souches libèrent au cours de l'hydrolyse acétique qui fournit les extraits, une substance perturbatrice de nature indéterminée.

Au cours de ce travail, nous avons pu constater l'hétérogénéité des souches de S. Typhi conservées au laboratoire depuis plus ou moins longtemps et qui paraissent identiques à l'examen bactériologique ; nous en avons souligné l'importance pour la fabrication des vaccins.

B I B L I O G R A P H I E

- 1.- BOIVIN A., IZARD Y. & SARCIRON R. - Recherches sur les antigènes somatiques du Bacille Typhique. Sur le dosage des antigènes glucidolipidiques O et Vi renfermés dans les corps bactériens du bacille d'Eberth.
C.R.Soc. Biol. (1939), 130, 1419.
- 2.- BOIVIN A. & MESROBEANU L. - Contribution à l'étude de la composition chimique des bactéries. Substances azotées et phosphorées "acido solubles".
C.R.Soc. Biol. (1933), 112, 76.
- 3.- BOIVIN A., MESROBEANU L. & MESROBEANU I. - Sur la teneur du bacille d'Aertrycke en substance polysaccharidique spécifique et antigénique.
C.R.Soc.Biol.(1934), 117, 271.
- 4.- COMBES R. - Résultats inédits.
- 5.- DISCHE Z. - New color reactions for determination of sugars in polysaccharides.
Methods of Biochemical Analysis (1955), 2 , 313.
- 6.- DISCHE Z. & SHETTLES L.B. - A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination.
Jl.Biol.Chem.(1948), 175, 595.
- 7.- DISCHE Z. & SHETTLES L.B. - A new spectrophotometric test for the detection of methylpentose.
Jl.Biol.Chem.(1951), 192, 579.
- 8.- DITTEBRANDT M. - Application of the Weichselbaum Biuret Reagent to the determination of spinal fluid protein.
Am.Jl.Clin.Path.(1948),18,439.

- 9.- DUBOS R.J. - The bacterial cell. (1946)
- 10.- FELIX A. & PITT R.M. - The pathogenic and immunogenic activities of S. Typhi in relation to its antigenic constituents.
Jl. of Hyg. (1951), 49, 92.
- 11.- FELIX A. & PITT R.M. - Virulence of Bact. Typhosus and resistance to O antibody.
Jl. Path. Bact. (1934), 38, 409.
- 12.- FELIX A. & PITT R.M. - A new antigen of Bact. Typhosus. Its relation to virulence and to active and passive immunisation.
Lancet (1934), 2, 186.
- 13.- FOUQUEY C., LEDERER E., LUDERITZ O., POLONSKY J., STAUB A.M., STIRM S., TINELLI R. & WESTPHAL O. - Synthèse de 3-6 didésoxyhexoses : détermination des sucres naturels : abéquose, colitose, tyvelose et ascarylose.
C.R. Ac. Sc. (1958), 246, 2417.
- 14.- FREEMAN G.G. - The preparation and properties of a specific polysaccharide from Bact. Typhosum Ty2.
Biochem. Jl. (1942), 36, 340.
- 15.- GRABAR P. - La technique immunologique quantitative et son emploi en immunologie et en chimie dans J. Loiseleur, Techniques de Laboratoires, E. Masson, Paris (1954), I, 817.
- 16.- HEIDELBERGER M. & KENDALL E.F. - A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody.
J. Exp. Med. (1929), 50, 809.
- 17.- HEIDELBERGER M. & KENDALL E.F. - Quantitative studies on the specific reaction, the determination of small amounts of a specific polysaccharide.
Jl. Exp. Med. (1932), 55, 555.
- 18.- HENDERSON D.W. & MORGAN W.T.J. - The isolation of antigenic substances from strains of Bact. Typhosum.
Brit. Jl. Exp. Pathol. (1938), 19, 82.

- 19.- JUDE A., LE MINOR L., & NICOLLE P. - Structure antigénique de deux variantes culturelles spontanées de S.Typhi.
C.R.Ac.Sc. (1955), 240, 822.
- 20.- KABAT E.A. & MAYER M. - Estimation of antigens, dans Experimental Immunology. E.Thomas (1948), 188.
- 21.- LE MINOR L. & GRABAR J. - Une variante de S.Typhi analogue à la souche O 901. Ann.Ins.Past. (1952), 83, 408.
- 22.- LEVADITI J.C. & AUGIER J. - Variante de la technique de Macchiavello applicable à la microscopie en fluorescence des bactéries.
Ann.Ins.Past. (1949), 76, 194.
- 23.- MA T. S. & ZUAZAGA P. - Industr.Engng.Chem. (1942), 14, 280.
- 24.- MAALOE O. - Pathogenic-Apathogenic transformation of S.Typhimurium I et II. Acta Path. et Microb.Scandinavica (1948), 25, 414 et 755.
- 25.- MAC DUFFIE F.C. & KABAT E.A. - A comparative study of methods used for analysis of specific precipitates in quantitative immunochemistry.
Jl.Imm. (1956), 77, 193.
- 26.- MEYER K. - Des relations entre les facteurs antigéniques chez les Salmonella. Nouvelle contribution à l'étude des antigènes complexes.
Ann.Ins.Past. (1939), 62, 282.
- 27.- MORGAN W.T.J. & PARTRIDGE S.M. - An examination of the antigenic complexes of B.Typhosum.
Brit.Jl.Exp.Pathol. (1942), 23, 151.
- 28.- NICOLLE P. & JUDE A. - Estimation quantitative de l'antigène Vi élaboré par quelques Entérobactériacées cultivées à différentes températures.
C.R.Ac.Sc. (1952), 234, 2313.
- 29.- RAESTRICK H. & TOPLEY W.W.C. - Immunising features isolated from Bact. Aertrycke.
Brit.Jl.Exp.Path. (1934), 15, 113.
- 30.- SMITH T. & REAGL A.L. - The non identity of agglutinins acting upon the flagell and upon the body of bacteria.
Jl.Med.Res. (1903), 10, 89.

- 31.- STAUB A.M. - Rôle des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques.
Ann. Ins. Past. (1954), 86, 618.
- 32.- STAUB A.M. & COMBES R. - Essai de dosage des antigènes somatiques au sein de S. Typhi (I).
Ann. Ins. Past. (1951) 80, 21.
- 33.- STAUB A.M. & COMBES R. - Essai de dosage des antigènes somatiques au sein de S. Typhi (II).
Ann. Ins. Past. (1952), 83, 528.
- 34.- STAUB A.M., COMBES & LE MINOR L. - Dosage de l'antigène O au cours de la conservation de quelques souches de S. Typhi en divers milieux.
Ann. Ins. Past. (1956), 91, 75.
- 35.- STAUB A.M. & DAVARPANAH C. - Etude immunochimique sur les Salmonelles. II. Analyse des précipitines de quelques sérums anti S. Gallinarum et anti S. Typhi.
Ann. Ins. Past. (1956), 94, 1132.
- 36.- STAUB A.M. & PON G. - Etude chimique du polyoside somatique typhique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1952), 34, 1132.
- 37.- STAUB A.M. & TINELLI R. - Etude immunochimique sur les Salmonelles. Structure chimique de certains motifs antigéniques présents dans les antigènes O 9 et 12 du tableau de White-Kauffman.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1957), suppl. n°1.
- 38.- WEBSTER M.E., SAGIN J.F., LANDY M. & JOHNSON A.G. - Studies on the O antigen of S. Typhosa. I) Purification of the antigen.
Jl. Imm. (1955), 74, 455.
- 39.- WESTPHAL O. - Polysaccharides in Biology (1956), 115.
- 40.- WESTPHAL O. - Bakterienreizstoffe und ihre Wirkungsweise. Angew. Chem. (1952), 64, 314.
- 41.- WESTPHAL O. & LUDERITZ O. - Chemische erforschung von Lipopolysacchariden gram negativer Bakterien.
Angew. Chem. (1954), 66, 213, 214, 407 et 417.
- 42.- WHITE P.B. - Notes on intestinal Bacilli with special reference to smooth and rough races.
Jl. Path. Bact. (1929) 32, 85.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	3
PLAN DU TRAVAIL	9
CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE S.TYPHI AYANT ETE UTILISEES AU COURS DE CE TRAVAIL	10

PREMIERE PARTIE

PREPARATION ET ETUDE DES POLYOSIDES PURIFIES EXTRAITS

<u>DE DIFFERENTES SOUCHES DE S.TYPHI</u>	13
CHAPITRE I - <u>Préparation des polyosides</u>	17
Préparation des bacilles secs	17
Hydrolyse des bacilles	18
Purification des bacilles	19
Conclusion	19
CHAPITRE II - <u>Etude chimique du polyoside purifié</u>	21
Dosage de l'azote	21
Dosage du rhamnose	22
Conclusion	24
CHAPITRE III - <u>Etude immunochimique du polyoside purifié</u>	27
Principe de cette étude	27
Résultats	30
Conclusion	32

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHE D'UNE TECHNIQUE PERMETTANT D'OBTENIR DES EXTRAITS CONTENANT DES POLYOSIDES IDENTIQUES ENTRE EUX ET IDENTIQUES AU POLYOSIDE PURIFIE . 35

CHAPITRE I	- <u>Etude des polyosides bruts présents dans les extraits de STAUB et COMBES</u>	39
	Préparation des extraits	39
	Dosage immunochimique du polyoside dans les extraits ...	42
	Dosage du rhamnose dans les extraits et teneur des polyo- sides bruts en ce sucre	43
	Conclusion	43
CHAPITRE II	- <u>Etude des conditions susceptibles de causer des différences entre le polyoside pur et le polyoside brut</u>	45
	Préparation du polyoside brut avec des bacilles lavés par la solution physiologique	46
	Préparation du polyoside brut avec des conditions d'hy- drolyse différentes	49
	Préparation du polyoside brut avec des précipitations fractionnées par 1 et 6 volumes d'alcool	49
	Préparation du polyoside brut avec dialyse	50
	Préparation du polyoside purifié sans précipitation acétique	50
	Conclusion	51
CHAPITRE III	- <u>Etude des conditions permettant d'obtenir le polyoside brut à 20 % de rhamnose</u>	53
	Influence du temps de culture	53
	Culture sur gélose nutritive	54
	Culture en bouillon	54
	Influence du milieu de culture	56
	Milieu liquide	58
	Milieu solide	59
	Conclusion	59
CONCLUSION	de la Deuxième Partie	60

T R O I S I E M E P A R T I E

<u>MISE AU POINT ET PREMIERE APPLICATION D'UNE TECHNIQUE DE "ROUTINE"</u>	61
CHAPITRE I - <u>Essai de dosage direct du rhamnose dans les bacilles</u>	65
Conclusion	67
CHAPITRE II - <u>Réduction des temps opératoires et mise au point sur la</u>	
<u>souche T. 1490 d'une technique pratique</u>	69
Réduction des temps opératoires	69
Réduction du matériel utilisé	71
Technique exacte du dosage	74
Préparation de la suspension microbienne	74
Dosage d'azote et hydrolyse	75
Préparation de l'extrait et dosage du rhamnose	75
Calcul de la valeur P/N	76
Conclusion	76
CHAPITRE III - <u>Essai de généralisation de la technique et retour au dosage</u>	
<u>final par immunochimie</u>	77
Application aux 7 souches	77
Essais de modification du temps d'hydrolyse	78
Essais de modification de la technique de DISCHE et	
SHETTLES	79
Essais de destruction de la substance perturbatrice	81
Technique du dosage de routine immunochimique et résul-	
tats	82
Application de ce dosage	82
<u>DISCUSSION et CONCLUSION de la Troisième Partie</u>	83
RESUME et CONCLUSIONS	87
CONCLUSION	91
BIBLIOGRAPHIE	93

